

Eine neue Methode zur Darstellung von Xanthomegnin aus *Trichophyton rubrum*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus Liebig Universität Gießen

Vorgelegt von Anna Regina Tigges
Aus Menden

Gießen 2009

Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. P. Mayser
Universitätsklinikum Gießen u. Marburg GmbH, Standort Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Mayser
2. Gutachter: PD Dr. Reuner
Datum der Disputation: 10. Februar 2009

Folgende Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Abstract (Vortrag)

Tigges, A. and Mayser, P. (2007) A new method for the isolation of Xanthomegnin from *Trichophyton rubrum*. *Mycoses*, 50 (5):351

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures

DC: Dünnschichtchromatographie

E : Epidermophyton

HPLC: High Performance Liquid Chromatographie

M : Mikrosporum

NMR: Nuclear magnetic resonance

PCR : Polymerase chain reaction

Rf: relative Wanderungsgeschwindigkeit

T: Trichophyton

UV: Ultraviolett

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	7
1.1 Dermatophyten	7
1.1.1 Taxonomie und Ökologie	7
1.1.2 Morphologie und Physiologie	9
1.1.3 Pigmentbildung	11
1.2 Naphthoquinone und Xanthomegnin	13
1.3 Dermatophytosen	15
1.3.1 Pathogenitätsfaktoren	16
2 PROBLEMSTELLUNG	18
3 MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 Anzucht und Nährmedien	19
3.1.1 Dermatophyten	19
3.1.2 Anzucht der Dermatophyten	20
3.1.2.1 Anzucht im festen Nährmedium	20
3.1.2.2 Anzucht im flüssigen Nährmedium	20
3.1.3 Anzucht zur Pigmentbildung	21
3.1.3.1 Nährmedien	21
3.1.3.2 Aufbereitung des Pilzmaterials und Anzucht auf den Pigment-Nährmedien	23
3.1.4 Testung auf Pigmentbildung	25
3.1.5 Tryptophan als Stickstoffquelle	25
3.1.6 Zeitabhängigkeit	26
3.1.7 pH-Abhängigkeit und Pilzwachstum	26
3.2 Gewinnung des Rohextraktes	28
3.2.1 Gewinnung des Rohextraktes aus festem 1b-Agar	28
3.2.2 Gewinnung des Rohextraktes aus flüssigem Nährmedium	28
3.3 Dünnschichtchromatographie	28
3.3.1 Analytische Dünnschichtchromatographie	28
3.3.2 pH-Stabilität der Substanzen	29
3.3.3 Präparative Dünnschichtchromatographie	30
3.3.4 Densitometrie	31
3.4 HPLC	31
3.4.1 Analytische HPLC	31
3.4.2 Präparative HPLC	32
3.5 Strukturaufklärung	32

4 ERGEBNISSE	33
4.1 Pigmentbildung	33
4.1.1 Bildung von Pigment durch <i>Trichophyton rubrum</i> mit verschiedenen Stickstoffquellen	33
4.1.1.1 Aminosäuren	33
4.1.1.2 Andere Stickstoffquellen	34
4.1.2 Bildung von Pigment durch <i>Trichophyton rubrum</i> mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle	35
4.1.2.1 Bildung von Pigment im festen 1b-Medium	35
4.1.2.2 Bildung von Pigment im flüssigen Nährmedium	35
4.1.2.3 Pigmentbildung im Difco-Nährmedium	36
4.1.2.4 Pigmentbildung in Abhängigkeit des Pilzalters	37
4.1.3 Bildung von Pigment durch andere Dermatophyten	38
4.2 Dünnschichtchromatographische Versuche	40
4.2.1 Analytische Dünnschichtchromatographie	40
4.2.2 pH-Stabilität der Substanzen	45
4.2.3 Zeitabhängigkeit der Xanthomegnin-Produktion	46
4.2.4 Abhängigkeit der Xanthomegnin-Produktion vom pH-Wert des Nährmediums	47
4.4 Wachstum des Pilzes	48
4.5 Verhalten des pH-Wertes des Nährmediums während der Inkubation	50
4.6 Densitometrische Versuche	50
4.7 Strukturaufklärung	53
4.8 Essay zur Produktion von Xanthomegnin	54
5 DISKUSSION	55
6 LITERATURVERZEICHNIS	71
7 TABELLENANHANG	80
8 ZUSAMMENFASSUNG	92
9 SUMMARY	93

1 Einleitung

1.1 Dermatophyten

Als Dermatophyten wird eine Gruppe von nah verwandten Pilzen bezeichnet, die durch Ihre Eigenschaft, keratinhaltige Gewebe zu verstoffwechseln, sowohl beim Menschen als auch beim Tier Infektionen der Haut, Haare und Nägel verursachen können. Die Ursache der heute als „Tinea“ bezeichneten Krankheit wurde erstmals in der Mitte des 19. Jahrhunderts durch drei europäische Wissenschaftler untersucht: Robert Remak, Lukas Schönlein und David Gruby (Ajello, 1974). Remak fand 1835 unter dem Mikroskop in Läsionen des „Favus“, wie damals die schuppige Erkrankung der Kopfhaut genannt wurde, stab- und knospenähnliche Strukturen (Seeliger, 1985), die wenig später von Schönlein als pilzartig erkannt wurden (Koelbing, 1990). Unabhängig von Remak und Schönlein beschäftigte sich David Gruby zwischen 1841 und 1844 mit der Ätiologie des Favus und beschrieb drei verschiedene Pilzarten, die er in Schuppen von infizierten Bärten und Kopfhäuten fand und „Mikrosporum audouini“, „Herpes tonsurans“ und „Mentagrophyt“ nannte (Weitzman & Summerbell, 1995). 1910 veröffentlichte Raimond Sabouraud seine bedeutende Abhandlung über Dermatophyten und ihre Infektionen „Les Teignes“, in der er Morphologie, Kultivierung und eine Taxonomie der verschiedenen Pilzarten beschrieb und außerdem Therapien der Dermatophytosen darstellte (Sabouraud, 1910). Sabouraud gilt heute als einer der bekanntesten und einflussreichsten Dermatomykologen des frühen 20. Jahrhunderts (Weitzman & Summerbell, 1995) und legte den Grundstein für die Kultivierung von Dermatophyten und die Therapie der Tinea.

1.1.1 Taxonomie und Ökologie

Eine heute gebräuchliche Einteilung für die anamorphe, das heißt asexuelle Form der Dermatophyten in „Epidermophyton“, „Mikrosporum“ und „Trichophyton“ wurde 1934 von Chester Emmons auf der Basis von Sabourauds Arbeiten unter Berücksichtigung seiner eigenen Beobachtungen bezüglich ihrer Sporenmorphologie und akzessorischen Organanhängen erstellt (Emmons, 1934). Diese Klassifikation wurde mit der Zeit häufig überarbeitet und aktualisiert (Simpanya, 2000), Vanbreuseghem beispielsweise erstellte aufgrund seiner Beobachtungen eine eigene Klassifikation, die der von Emmons ähnelte,

jedoch noch die Gattungen der Mikroides und der Keratinomyces enthielt (Vanbreuseghem, 1977). In neuerer Zeit sind hauptsächlich molekulargenetische Untersuchungen ausschlaggebend für immer neue Modifikationen der Emmons-Klassifikation (Blanz, Buzina et al., 2000; De Hoog, Bowman et al., 1998; Graser, Kuijpers et al., 1999).

Anfang der 60er Jahre fand man heraus, dass von einigen Dermatophytenarten auch eine sexuelle, teleomorphe Phase im Wachstumszyklus besteht, wie zum Beispiel von *M.gypseum* oder *T.terrestre* (Griffin, 1960). Die teleomorphe Form eines Dermatophyten bekam die auch in der heutigen Zeit noch gebräuchliche Bezeichnung „Arthroderma“ (Dawson & Gentles, 1961), jedoch ist bis heute noch nicht von allen Dermatophytenarten eine teleomorphe Form bekannt (Simpanya, 2000).

Eine weitere Einteilung der Dermatophyten besteht nach ökologischen Gesichtspunkten, je nach Wirtsspezifität werden sie der geophilen, zoophilen oder anthropophilen Gruppe zugeordnet. Geophile Dermatophyten leben gewöhnlicherweise als Saprophyten im Boden und ernähren sich neben Kohlenstoff von Keratin aus Haaren, Hufen, Federn etc., die Tiere dort zurückgelassen haben (Gräser, De Hoog et al., 2006; Tampieri, 2004; Tampieri, 2006; Weitzman & Summerbell, 1995). Tiere stellen den vornehmlichen Wirt von zoophilen Dermatophyten dar. Diese können aber auch beim Menschen Dermatomykosen verursachen, wie es zum Beispiel bei der Mikrosporie der Fall ist, eine Mykose der Kopfhaut bei Kindern, verursacht durch *Mikrosporum canis*, der ursprünglich Hund und Katzen bewirbt (Gupta & Summerbell, 2000; Seebacher, 2003; Standke, 1972). Anthropophile Dermatophyten befallen vornehmlich Menschen und werden auch über direkten oder indirekten Körperkontakt von Mensch zu Mensch übertragen. In der Literatur sind jedoch auch Fälle beschrieben, in denen Tiere mit anthropophilen Dermatophyten wie zum Beispiel *Trichophyton rubrum* infiziert wurden (Brilhante, Cordeiro et al., 2006; Kushida & Watanabe, 1975). Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Auflistung der heute bekannten Dermatophytenarten und ihrer ersten Entdecker.

Tabelle 1: Heute bekannte Dermatophyten-Arten eingeteilt nach ökologischen Gesichtspunkten, aus: Weitzmann et al, The Dermatophytes

Anthropophil	Zoophil	Geophil
<i>E.floccosum</i> (Harz, 1870) <i>M.audouinii</i> (Gruby, 1843) <i>M.ferrugineum</i> (Ota, 1921) <i>T.concentricum</i> (Blanchard, 1895) <i>T.gourvillii</i> (Catanei 1933) <i>T.megninii</i> (Blanchard, 1896) <i>T.mentagrophytes</i> (Robin 1853) <i>T.mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> (Priestley, 1917) <i>T.mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i> (Smith & Marples, 1963) <i>T.rubrum</i> (Castellani, 1910) <i>T.schoenleinii</i> (Lebert, Gedoelst, 1902) <i>T.soudanense</i> (Joyeux, 1912) <i>T.tonsurans</i> (Malmsten, 1845) <i>T.violaceum</i> <i>T.yaoundei</i> (Cochet & Doby-Dubois, 1957)	<i>M.canis</i> (Bodin 1902) <i>M.equinum</i> (Guegen, 1904) <i>M.gallinae</i> (Grigorakis, 1929) <i>M.persicolor</i> (Gular & Grigorakis, 1928) <i>T.equinum</i> (Gedoelst, 1902) <i>T.simii</i> (Pinoy, 1912) <i>T. verrucosum</i> (Bodin, 1902)	<i>E. stockdaleae</i> (Prochaki & Engelhardt-Zasada, 1974) <i>M.amazonicum</i> (Moraes, Borelli & Feo, 1967) <i>M.boullardii</i> (Domonik & Majchrowicz, 1965) <i>M.cookei</i> (Ajello, 1959) <i>M.gypseum</i> (Bodin, 1902) <i>M.nanum</i> (Fuentes, 1956) <i>M.praecox</i> (Rivalieri, 1954) <i>M.racemosum</i> (Borelli, 1965) <i>M.ripariae</i> (Hubalek & Rush-Munro, 1973) <i>M.vanbreuseghemii</i> (Georg, Ajello, Friedman & Brinkmann, 1962) <i>T.ajelloi</i> (Vanbreuseghem, 1952) <i>T.flavescens</i> (Padhye & Carmichael, 1971) <i>T.gloriae</i> (Ajello, 1967) <i>T.longifusum</i> (Ajello, 1968) <i>T.phaseoliforme</i> (Borelli & Feo, 1966) <i>T.terrestre</i> (Durie & Frey, 1957) <i>T.vanbreuseghemii</i> (Rious, Jarry & Juminer, 1964)

1.1.2 Morphologie und Physiologie

Dermatophyten gehören zu den filamentösen, myzelbildenden Pilzen und werden der Gruppe der Ascomyzeten (Schlauchpilze) zugeordnet. Die Hyphen zeigen ein vielseitiges morphologisches Bild je nach Pilzart und Fortpflanzungsstadium. In der vegetativen, asexuellen Phase bilden die Pilze zur Vermehrung und Ausbreitung ihrer Art durch mitotische Kernteilung eine Vielzahl unterschiedlicher Konidiosporen. Die Ausprägung von Konidien ist ein wichtiges Kriterium zur Identifikation der einzelnen Dermatophytenarten. Glattwandige, vielzellige Makrokonidien sind Kennzeichen für Trichophyten, die Makrokonidien der *Mikrosporum*-Spezies sind von eher spindelförmiger, dickwandiger Form und besitzen eine raue Oberfläche. Beide Gattungen bilden einzellige Mikrokonidien. Die *Epidermophyton*-Species zeichnet sich durch keulenförmige Makrokonidien aus, Mikrokonidien fehlen (Weitzman & Padhye, 1996).

Die Zellwand der Dermatophyten besteht zu fast 90 % aus Kohlenhydraten, vornehmlich aus Chitin, Glukanen und Mannanen (Kayser, Bienz et al., 2001). Das Wachstum erfolgt immer von der apikalen Region der Konidien ausgehend, so dass die Hyphen auch in feste Materialien eindringen können, indem sie durch Sekretion von lytischen Enzymen, wie zum Beispiel Keratinasen, die entsprechenden Substrate verdauen und so notwendige Nährstoffe erhalten (Wessels, 1993). Das apikale Wachstum erklärt auch die annähernd runde Form, die eine Pilzkultur auf flachem Untergrund meist zeigt. Durch die Verzweigungen der Konidien können sie immer in die Richtung vorstoßen, die den größtmöglichen Raum zur Nahrungsaufnahme bietet. Dieses Phänomen lässt sich sogar in vivo beobachten, betrachtet man die sich zirkulär ausbreitenden Areale auf der Haut eines infizierten Menschen.

Die Hauptnahrungsquelle von Dermatophyten bilden Proteine, die vielen Dermatophyten als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffresource dienen, eine Verstoffwechslung von Polysacchariden und Lipiden liegt meist nur in eingeschränkter Weise vor (Kunert, 2000). Um die Nährstoffe zu verwerten, benutzen diese Pilze extrazelluläre lytische Enzyme, vornehmlich Proteinasen, aber auch lipolytische Enzyme sind bekannt (Hellgren & Vincent, 1980; Qadripur, 1989). Neben vielen anderen Proteinen dient vor allem Keratin den Dermatophyten als Nahrungsquelle; um es zu zersetzen, werden von den keratinophilen Pilzen so genannte Keratinasen gebildet. Hierbei handelt es sich um einen Komplex aus verschiedenen proteolytischen Enzymen, die in der Lage sind, Substanzen wie Hautschuppen, Nägel und Haare zu zersetzen und so die benötigten Nährstoffe wie Kohlenstoff, Stickstoff und auch Schwefel freizusetzen (Wawrzkievicz, Wolski et al., 1991). Die Sekretion und Aktivität der Proteinasen wird in der Regel durch die Anwesenheit von Proteinen und vor allem von Keratin stimuliert (Samdani, 2005). Man hat aber auch Enzyme gefunden, die in Abwesenheit dieser Materialien sezerniert wurden (Apodaca & McKerrow, 1989). Durch Zusatz von anderen potentiellen Stickstoffquellen wie Glucose oder auch Aminosäuren wurde jedoch mehrfach eine Suppression der Enzymsekretion beobachtet (Apodaca & McKerrow, 1989; Meevootisom & Niederpruem, 1979). Der Gebrauch von Aminosäuren als Stickstoffquelle in Nährmedien für Dermatophyten wurde in der Literatur häufiger diskutiert. Zahlreiche Untersuchungen ergaben, dass in Bezug auf das Wachstum der einzelnen Dermatophytenarten Glutamat, Glutamin und die Aminosäuren des Harnstoffzyklus Ornithin, Arginin und Citrullin am besten als Stickstoffquellen

geeignet waren, gefolgt von Asparagin, Prolin, Serin, Alanin, Glycin, Histidin und Tyrosin in unterschiedlichen Ausprägungen. Aminosäuren mit eher komplizierterer Struktur wie Tryptophan, Valin, Isoleucin und Phenylalanin schienen eher ungeeignete Stickstoffquellen für das Wachstum von Dermatophyten zu sein (Silva, 1958;Takahashi, 1962;Takasuka, 2000). Auch Harnstoff scheint sich zur Bereitstellung von Stickstoff für das Pilzwachstum in gewissem Maße zu eignen (Rippon & LeBeau, 1965).

Die proteolytischen Enzyme der Dermatophyten besitzen vornehmlich einen optimalen pH-Wert von 6-9, es sind aber auch Enzyme gefunden worden, die erst bei einem sauren pH-Wert im Bereich von 4 sezerniert wurden (Tanaka, Summerbell et al., 1992;Tsuboi, Ko et al., 1989). Die Vorliebe der Proteasen für einen neutralen bis alkalischen pH-Wert lässt auf das Wachstumsoptimum der Pilze an sich schließen, das ebenso eher im neutralen pH-Bereich liegt (Kunert, 2000). In diesem Zusammenhang sei auch die Eigenschaft der keratinophilen Pilze zu nennen, ihr Wachstumsmedium zu alkalisieren, wenn es Proteine, Peptide oder Aminosäuren enthält. Der beim enzymatischen Abbau der Proteine anfallende überflüssige Stickstoff wird über Ammonium-Ionen abgebaut, so dass im Verlauf des Wachstums der pH der Kultur Werte von 8 bis 9 annehmen kann bei einem Ausgangs-pH von 6-7 (Paveia, 1975;Refai & Rieth, 1964). Diese Eigenschaft hat man sich zunutze gemacht, indem man Indikator-Medien zur Identifikation von Dermatophyten entwickelte (Brasch, 2004).

Das Temperaturoptimum zum Wachstum von Dermatophyten liegt je nach Pilzart zwischen 25 und 30 °C. Sie zeigen aber Anpassungsfähigkeit an die Körpertemperatur und sind meist thermotolerant für Temperaturen bei 37 °C (Engelhardt-Zasada & Prochacki, 1972).

1.1.3 Pigmentbildung

Dass pathogene Hautpilze Pigmente bilden, ist bekannt, seit man in der Lage ist, sie zu kultivieren. Allen voran ist hier *Trichophyton rubrum* zu nennen, der seinen Namen aufgrund seiner roten Kulturfarbe trägt. Erste wissenschaftliche Untersuchungen über die Pilz-Pigmente wurden Ende der zwanziger Jahre von Tate angestellt, sie beschäftigten sich mit den Farbtönen einzelner Dermatophyten und ihrem Verhalten in saurem oder alkalischem Milieu (Tate, 1929). In den folgenden Jahrzehnten untersuchten mehrere Arbeitsgruppen zum einen die Bedingungen zur

Pigmentproduktion, zum Beispiel im Hinblick auf Glukose oder Aminosäuren (Silva, 1953; Zussman, Vicher et al., 1961), andere versuchten, die Pigmente zu extrahieren und ihre Herkunft zu ermitteln, wie Wirth et al. und auch Mier, die das rote Pigment von *Trichophyton rubrum* als Anthrachinonderivate charakterisierten (Mier, 1957; Wirth, O'Brien et al., 1957), wohingegen Zussmann et al. die Farbstoffe für melanoides Pigment hielten (Zussman, Lyon et al., 1960). Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass die Kulturfarbe der verschiedenen Dermatophyten aus einer Mischung verschiedener Pigmente gebildet wird, außerdem wurde belegt, dass *Trichophyton rubrum* im sauren Milieu eine gelbe, im alkalischen Milieu eine rote bis braune Farbe annimmt (Walker & Milovanovic, 1970). Heute wissen wir, dass die von den Dermatophyten gebildeten Farbstoffe hauptsächlich sekundäre Metabolite der Polyketid-Synthese darstellen und zu den heptaketiden Naphthoquinonen gehören (Weitzman & Summerbell, 1995). Das zuerst entdeckte Produkt dieser Art ist wohl das Xanthomegnin, ein Naphthoquinon, welches seinen Namen von *Trichophyton megninii* bekommen hat, aus dem es zuerst extrahiert wurde (Blank, Day et al., 1963).

Kulturen von Dermatophyten sind je nach Art und auch äußeren Einflüssen in den unterschiedlichsten Farbvarianten zu finden, sie reichen von Hellgelb über Rot und Violett zu bräunlichen Tönen. Die unten stehenden Abbildungen zeigen einige Dermatophytenarten, gewachsen auf Selektivagar für pathogene Pilze, hauptsächlich bestehend aus Agar Agar, Pepton und notwendigen Nährsalzen. Ob und in wieweit die Pigmentbildung der Dermatophyten bestimmte Funktionen erfüllt, wurde häufig diskutiert, bleibt bisher jedoch nur wenig bekannt (Summerbell, 2000).



Abbildung 1 : Dermatophyten auf Selektiv-Agar für pathogene Pilze, von links nach rechts:
T. violaceum, *T. soudanense*, *M. canis*

1.2 Naphthoquinone und Xanthomegnin

Naphthoquinone sind sekundäre Metabolite aus dem Stoffwechsel verschiedener Pilze, Actinomyceten und auch höheren Pflanzen (Babula, Mikelova et al., 2006). Sie sind sehr vielgestaltig in Bezug auf ihre biologischen Eigenschaften und können unter anderem phytotoxisch, insektizid, antibakteriell oder fungizid wirken, auch zytostatische und antikarzinogene Eigenschaften wurden untersucht (Medentsev & Akimenko, 1998).

Naphthoquinone sind farbige Substanzen und stammen aus dem Polyketid- oder dem Isoprenoidstoffwechsel ihrer Produzenten (Brigham, Michaels et al., 1999). Welche Rolle die Produktion von Naphthoquinonmetaboliten für die Pflanzen und Pilze im Einzelnen spielt, ist bis heute nicht sicher bekannt und es können nur Vermutungen angestellt werden (Medentsev & Akimenko, 1998).

Von Pilzen produzierte Naphthoquinone wurden vorrangig bei einigen Arten der *Aspergillus*- oder der *Fusarium*-Spezies oder auch bei *Penicillium viridicatum* gefunden (Peterson & Grove, 1983), aber auch einige Dermatophyten sind für die Produktion dieser sekundären Metabolite bekannt. Viele dieser Substanzen besitzen die Eigenschaften von Mykotoxinen. Hier sei vor allem das Xanthomegnin zu nennen, ein dimeres Naphthoquinon, das zuerst 1963 bei *Trichophyton megninii* entdeckt wurde und daher seinen Namen trägt (Blank, Day, & Just, 1963), wenig später konnte das von *Trichophyton rubrum* produzierte Pigment als Xanthomegnin identifiziert werden (Blank, Day, & Just, 1963; Wirth, Beesley et al., 1964). Es handelt sich um ein Binaphthochinonlacton (siehe Abbildung 1), ein Anthrachinon-Derivat, welches über den Polyketidsyntheseweg aus kleinen Startermolekülen (wie Acetyl-CoA, Malonyl-CoA) gebildet wird.

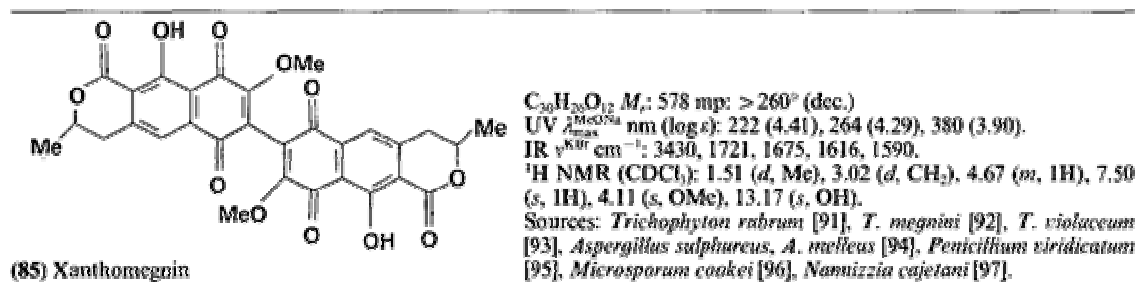


Abbildung 2: Strukturformel von Xanthomegnin, aus: Medentsev et. al.,
Naphthoquinonmetabolites of the fungi

Xanthomegnin fand sich außerdem noch in den Dermatophyten *Trichophyton violaceum* und *Mikrosporum cookei* (Ito, Nozawa et al., 1970). Eine besondere Eigenschaft stellt seine Farbe dar, die im sauren Milieu einen gelben, im alkalischen Milieu einen dunkelroten Ton annimmt; so verhält sich auch die Kulturfarbe von *Trichophyton rubrum*. Junge Kulturen von *Trichophyton rubrum* haben zunächst eine hellgelbe Farbe, wird das Wachstumsmedium im Laufe des Pilzwachstums durch die Ammoniumionenproduktion des Pilzes alkalisiert, wechselt die Farbe der Kultur in ein tiefes Rot. Abbildung 3 zeigt die Unterseite einer 14 Tage alten Kultur von *T. rubrum* auf Selektivagar für pathogene Pilze. Das Zentrum erscheint hier rot, die Ränder noch gelb.



Abbildung 3: *T. rubrum* mit seiner charakteristischen Kulturfarbe

Xanthomegnin als Mykotoxin ist vor allem bei der Kontamination von Tierfutter bedeutsam, wird dort hauptsächlich durch *Aspergillus* oder *Penicillium* spp. produziert und wirkt bei Tieren nephro- und hepatotoxisch (Carlton, Stack et al., 1976; Carman, Kuan et al., 1984). Weiterhin wurden Interaktionen mit der zellulären Atmungskette sowie genotoxische Potentiale von Xanthomegnin nachgewiesen (Carman, Kuan, Francis, Ware, & Luedtke, 1984; Kawai & Cowger, 1981; Mori, Kawai et al., 1983).

Gupta et. al. konnten 2000 Xanthomegnin aus mit *T.rubrum* infiziertem Haut- und Nagelmaterial extrahieren und somit zeigen, dass es auch in vivo produziert wird. Es stellte sich nun die Frage, ob und in wie weit Xanthomegnin eine lokale toxische/immunmodulatorische Wirkung in den infizierten Hautarealen verursacht und ob es somit eine Rolle als Virulenzfaktor bei der Infektion mit *Trichophyton rubrum* spielt kann (Gupta, Ahmad et al., 2000).

1.3 Dermatophytosen

Durch Dermatophyten verursachte Infektionen der Haut werden als Tinea bezeichnet, je nach Lokalisation der Infektion werden Tinea barbae (Infektion des Bartes), Tinea capitis (Infektion der Kopfhaut), Tinea corporis (Infektion des Körpers), Tinea manum (Infektion der Hände), Tinea pedis (Infektion der Füße) und Tinea unguium (Infektion der Nägel) unterschieden. Häufigster Erreger der Tinea im mitteleuropäischen Raum ist mit 60 – 80 % *Trichophyton rubrum* (Jung & Moll, 2003; Seebacher, 2003), er verursacht vornehmlich die Tinea vom superfiziellen Typ, ausgehend vom Stratum corneum der Epidermis. Diese Art der Tinea kann sowohl akut entzündlich, das heißt mit vesikulären, dyshidrosiformen Effloreszenzen, als auch chronisch entzündlich mit langsam konzentrisch wandernden, randbetonten erythemato-squamösen Effloreszenzen in Erscheinung treten. Vor allem zoophile Dermatophyten rufen beim Menschen oft intensivere Entzündungen hervor.

Bei der Tinea profunda dringen die Pilze entlang der Haarfollikel in die Tiefe der Haut ein und verursachen so Pusteln und teils schwere entzündliche Infiltrate bis hin zu Abszessen, vornehmlich kommt dies bei Tinea barbae und Tinea capitis vor (Seebacher, 2001).



Abbildung 4: Tinea corporis

Die Diagnostik der Tinea beinhaltet, abgesehen von der Klinik, zum einen den mikroskopischen Nachweis von Pilzelementen im Nativpräparat, zum anderen die Anlage einer Pilzkultur. Auch Methoden zum Nachweis von Dermatophyten-DNA mittels PCR aus infiziertem Material haben sich in den letzten 10 Jahren etabliert (Gräser, El Fari et al., 1998; Iwen, Hinrichs et al., 2002).

Die Differenzierung der Dermatophytenarten erfolgt in der Praxis hauptsächlich über die makroskopische und mikroskopische Morphologie der Kultur, aber auch Tests zu physiologischen Eigenschaften wie zum Beispiel die Fähigkeit zur Urease-Produktion oder Enzymaktivitäten können verwendet werden. Mittlerweile ist auch eine Artdifferenzierung mittels molekulargenetischer Methoden möglich, dies hat sich jedoch in der Praxis bisher noch nicht etabliert (Brasch, 2004).

1.3.1 Pathogenitätsfaktoren

Von besonderem medizinischem Interesse sind Faktoren, die bei Dermatophyten eine pathogene Funktion haben. Um ein Gewebe besiedeln und infizieren zu können, müssen die Pilze zunächst Wege finden, eine ausreichende Haftung und Penetration zu erreichen. Eine Fähigkeit der Adhärenz der Konidien von Dermatophyten und Keratinozyten konnte in vitro nachgewiesen werden (Duek, Kaufman et al., 2004; Zurita & Hay, 1987). Zudem müssen Pilze auf der Haut mit anderen Mikroorganismen konkurrieren, die zur physiologischen Hautflora gehören. Es ist schon länger bekannt, dass Dermatophyten in der Lage sind, Antibiotika zu produzieren (Youssef, Wyborn et al., 1978), um sich mit vorhandenen Bakterien auseinandersetzen zu können.

Bei der Pathogenität der Dermatophyten spielen vor allem ihre proteolytischen Enzyme eine große Rolle. Diese wirken zum einen direkt pathogen auf den Wirt, indem sie im Gewebe enthaltene Proteine, vor allem Keratin, zur Ernährung der Pilze zersetzen. Zum anderen haben sie auch die Fähigkeit, die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Gewebes so zu verändern, dass es den Dermatophyten einen geeigneten Lebensraum bietet (Simpanya, 2000).

Ein weiterer Faktor der Pathogenität von Dermatophyten stellt sich durch die Fähigkeit der Pilze dar, antigene Substanzen freizusetzen, die am längsten bekannten sind die Trichophytine (Brasch, 1990). Hierbei handelt es sich um Substanzgemische verschiedener Glykoproteine, die sowohl zelluläre als auch

humorale Reaktionen beim Wirt verursachen können. Einige Dermatophyten und insbesondere *Trichophyton rubrum* sind jedoch auch in der Lage, diese Immunantworten durch Ausschüttung verschiedener Substanzen wie zum Beispiel den Mannanen zu unterdrücken (Dahl & Grando, 1994; Jones, 1993; Tagami, Kudoh et al., 1989). So kann eine komplette Eradikation des Dermatophyten durch den Wirt verhindert oder auch eine Reinfektion begünstigt werden (Dahl, 1993).

2 Problemstellung

Die Pigmentproduktion durch Dermatophyten wurde in der Literatur der letzten Jahrzehnte nur wenig beleuchtet. Neuere Untersuchungen zeigten, dass sich das Pigment und Mykotoxin Xanthomegnin auch in vivo in infiziertem Haut – und Nagelmaterial nachweisen lässt. Um eine mögliche Rolle dieses Stoffes oder auch anderer Metabolite in der Pathogenität dieser Pilze zu klären, sollten weitere Untersuchungen angestellt werden. Bisher war es problematisch, das instabile Xanthomegnin in größeren Mengen herzustellen, so dass Standard-Proben für weitere Untersuchungen nur schwer zu bekommen waren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung folgender Fragen:

1. Welche Dermatophyten produzieren Pigment und unter welchen Bedingungen?
2. Lassen sich die einzelnen Pigmentbestandteile darstellen und aufreinigen?
3. Unter welchen Bedingungen wird Xanthomegnin von *Trichophyton rubrum* produziert?
4. Kann eine einfache Methode entwickelt werden, mit der möglichst große Mengen Xanthomegnin extrahiert werden, so dass es für weitere Untersuchungen verwendet werden kann?

3 Material und Methoden

3.1 Anzucht und Nährmedien

3.1.1 Dermatophyten

Es wurde vornehmlich der Dermatophyt *Trichophyton rubrum* (Referenz- und Wildstämme) untersucht, außerdem noch eine Reihe anderer anthropophiler aber auch zoophiler und geophiler Dermatophyten. Die untersuchten Arten und ihre Stämme sind in unten stehender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2: Untersuchte Dermatophyten-Arten und -Stämme

<i>T. rubrum</i>	CBS 301.60
	Wildstamm 53a
	Wildstamm 134b
<i>T. rubrum</i> var. <i>granulare</i>	Wildstamm 1612
<i>T. equinum</i>	Wildstamm 953
<i>T. mentagrophytes erinacei</i>	Wildstamm 1830/04
<i>T. gallinae</i>	Wildstamm 1374
<i>T. megninii</i>	Wildstamm 831
<i>T. mentagrophytes</i>	CBS 318.56
	Wildstamm 81c
	Wildstamm 1425/03
<i>T. schoenleinii</i>	Wildstamm 34a
<i>T. soudanense</i>	Wildstamm 26a
<i>T. tonsurans</i>	CBS 419.52
	Wildstamm 156b
<i>T. verrucosum</i>	CBS 562.50
	Wildstamm 132
<i>T. violaceum</i>	CBS 453.61
	Wildstamm 1245
<i>M. canis</i>	CBS 113480
	Wildstamm 1685/04
<i>M. cookei</i>	Wildstamm 67b
<i>E. floccosum</i>	CBS 214.63
	Wildstamm 1635/04

* CBS: Referenzstämme des Centraalbureau voor Schimmelcultures.

3.1.2 Anzucht der Dermatophyten

3.1.2.1 Anzucht im festen Nährmedium

Die Dermatophyten wurden auf Selektivagar für pathogene Pilze (Merck, Darmstadt, FRG) verimpft und bei Zimmertemperatur bebrütet. Der Selektivagar für pathogene Pilze hat folgende Zusammensetzung (Angaben in g/L): Pepton aus Sojamehl 10,0; D(+)-Glucose 10,0; Cycloheximid 0,4; Chloramphenicol 0,05; Agar-Agar 12,5.

Für Folgeversuche sollte die Bebrütungsdauer einen Zeitraum von drei Wochen nicht überschreiten, denn es zeigte sich, dass zu alte Pilzkulturen nicht mehr ausreichend Pigment produzierten. Daher wurden auch in wöchentlichen Abständen frische Kulturen verimpft.

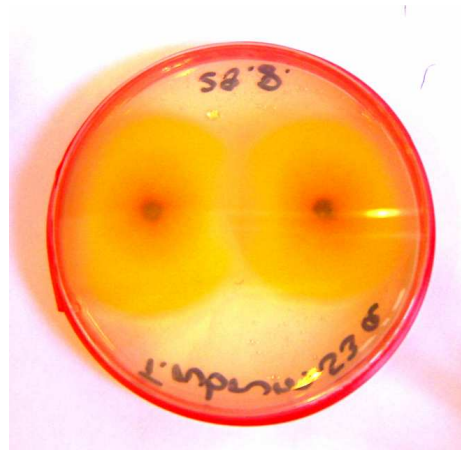
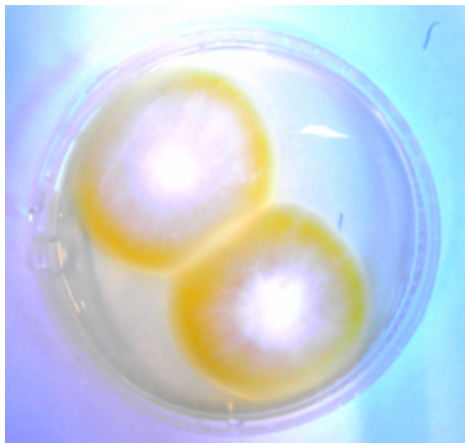


Abbildung 5: *Trichophyton rubrum* auf Selektiv-Agar, Ober- und Unterseite

3.1.2.2 Anzucht im flüssigen Nährmedium

Zur weiteren Verarbeitung musste der Pilz möglichst sorgfältig vom Anzuchtmedium getrennt werden, doch beim Abschneiden des Myzels vom Agar blieben meist noch Reste davon am Pilz hängen und ließen sich nur schwer lösen.

Um später eine bessere Trennung der Pilze vom Nährmedium zur weiteren Anzucht für die Pigmentbildung zu ermöglichen, wurde daher außerdem ein flüssiges Nährmedium hergestellt, das die Inhaltsstoffe des Selektivmediums für pathogene Pilze enthält, mit Ausnahme des Agar-Agar. Die Herstellung des Mediums erfolgte demnach wie unten angegeben:

1 % Pepton aus Sojamehl	(Merck, Darmstadt, FRG)
1% D(+)-Glucose	(Merck)
0,04 % Cycloheximid	(Sigma, Aldrich, Steinheim, FRG)
0,005% Chloramphenicol	(Merck)

Auf 100 ml Aqua dest. wurden also 1g Pepton und 1g Glukose eingewogen und autoklaviert. Chloramphenicol fand in Form einer Stammlösung Verwendung (6,25 mg auf 1ml Aqua dest., Sterilfiltration und Lagerung bei –20°C), daher hier 0,8 ml der Stammlösung Chloramphenicol und 0,04 g Cycloheximid. Aufgrund der Temperaturempfindlichkeit der Antibiotika wurden Cycloheximid und Chloramphenicol erst nach Abkühlen der Flüssigkeit auf 50 °C hinzugegeben. Nach Herstellung des Nährmediums wurde dann 3 g des entsprechenden Pilzmaterials (feste Form, von Agar-Nährboden abgetrennt) hinein gegeben und nicht länger als 3 Tage im Erlenmeyerkolben auf einem handelsüblichen Magnetrührer bei 24 °C gerührt.

3.1.3 Anzucht zur Pigmentbildung

3.1.3.1 Nährmedien

Um eine stärkere Pigmentbildung der Dermatophyten zu induzieren, wurde ein spezielles Glukose-Nährmedium verwendet, das als Zusatz zunächst verschiedene Aminosäuren als Stickstoffquelle enthielt und 1b-Nährmedium genannt wurde. Es wurde hier sowohl in fester als auch in flüssiger Form verwendet. Die Grundzusammensetzung des Nährmediums stellte sich wie folgt dar (pro 100ml Aqua dest.):

Tabelle 3: Zusammensetzung des 1b Nährmediums

fest	flüssig
1 g Glukose	1 g Glukose
15 g Magnesiumsulfat	0,15 g Magnesiumsulfat
0,3 g Kaliumhydrogenphosphat	0,3 g Kaliumhydrogenphosphat
2 g Agar reinst	
2 ml Tween 80	
<i>Stickstoffquelle</i>	<i>Stickstoffquelle</i>

In dieses Nährmedium wurde nun die jeweilige Stickstoffquelle eingewogen. Die Auswahl der Aminosäuren erfolgte unter der Berücksichtigung ihrer Vorkommen auf der Haut und im Schweiß (Spier & Pascher, 1955). Die getesteten Aminosäuren (alle Sigma) und die jeweilige einzuwiegende Menge sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt. Zusätzlich zu den Aminosäuren wurden noch die Stickstoffquellen Urea und Ammoniumsulfat getestet. Tyrosin wurde in der Vergangenheit als gute Stickstoffquelle zur Pigmentproduktion beschrieben (Zussman, Lyon, & Vicher, 1960), es stellte sich jedoch heraus, dass es wegen seiner geringen Löslichkeit in dem flüssigen Medium hier keine Verwendung finden konnte. Zussman et. al. wendeten feste Nährmedien an und beschrieben dieses Problem nicht.

Tabelle 4: Verwendete Stickstoffquellen

Aminosäure	Molekulargewicht	g/100ml
Alanin	89,09	0,13
Glycin	75,07	0,11
Leucin	131,18	0,20
Phenylalanin	165,2	0,25
Threonin	119,1	0,18
Tryptophan	204,23	0,3
Serin	105,1	0,16
Valin	117,1	0,17
Ammoniumsulfat	132,14	0,21
Urea	60,06	0,09

Die Inhaltsstoffe wurden in Aqua dest. eingewogen und autoklaviert, die Aminosäuren wurden aufgrund Ihrer Temperaturempfindlichkeit erst nach Abkühlen der Flüssigkeit sterilfiltriert hinein gegeben. Tween als Lipidquelle wurde nur für den festen Ansatz verwendet, da bei der späteren Extraktion mit Ethylacetat das Nährmedium zu einer milchig trüben Flüssigkeit reagierte, so dass eine weitere Verarbeitung der Kultur nicht mehr möglich war. Für das feste Nährmedium wurden jeweils 10 ml des noch flüssigen Mediums unter einer Laminar-air-flow Arbeitsbank in sterile Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, DK) gegossen.

Das flüssige Nährmedium konnte direkt nach Einrühren der Aminosäure verwendet werden. Weiterhin wurde Difco Yeast Carbon Base (Becton, Dickinson and Company, Sparks) als Nährmedium verwendet, das nur geringe Mengen an Aminosäuren sowie zahlreiche Nährstoffe, Vitamine und Salze enthält und dem dann noch Tryptophan zugegeben wurde. Dieses Medium wurde ausschließlich in flüssiger Form angewendet. (Genaue Zusammensetzung siehe Anhang).

3.1.3.2 Aufbereitung des Pilzmaterials und Anzucht auf den Pigment-Nährmedien

Für die Anzucht auf den 1b-Medien wurden versuchsweise verschiedene Methoden verwendet, wozu jeweils eine eigene Aufbereitung des Pilzmaterials notwendig war.

a) Verwendung des festen Nährmediums

Als relativ zeitaufwändige Methode erwies sich die Verimpfung des Pilzes vom festen Selektiv-Medium in das feste 1b-Medium, da hier mehrere Stücke des Pilzes verimpft werden mussten, um ausreichend Pigment für die HPLC-Analyse zu produzieren. Es wurden hierbei 40 Platten des 1b-Medium beimpft und bei 24 °C mindestens 4 Wochen lang bebrütet.

b) Verwendung des flüssigen Nährmediums

Bei Verwendung des flüssigen Nährmediums wurde der Pilz mit Hilfe eines Skalpell vom festen Selektiv-Nährmedium unter Mitnahme einer möglichst geringen Menge Nährbodens entfernt. Das so gewonnene Pilzmaterial wurde mit dem Skalpell in möglichst kleine Stücke zerteilt und dann abgewogen in die flüssige Kultur gegeben. Pro 100 ml Nährmedium wurde 1g Pilzmaterial eingewogen.

Diese Mengenangabe beruht auf einem Erfahrungswert, in der Literatur sind keine genauen Angaben der verwendeten festen Pilzmenge bei Pigmentuntersuchungen gemacht, Wirth et. al. sprechen lediglich von einem von der Agar-Platte geschnittenen „großen Stück Myzel“ (Wirth, O'brien, Schmitt, & Sohler, 1957). Der Ansatz wurde anschließend bei 24 °C auf dem Magnetrührer inkubiert.

Um zu verhindern, dass noch Teile vom Selektiv-Medium in das Medium zur Pigmentbildung gelangen, wurde der im flüssigen Selektiv-Medium angezüchtete Pilz gewaschen. Dazu wurde zunächst der Pilz samt Nährmedium in sterile Kunststoffröhrchen gegeben und 5 Minuten bei 1500G zentrifugiert. Das nun überstehende flüssige Nährmedium wurde steril mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Anschließend wurde das Waschen mit steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung ein weiteres Mal wiederholt, dann wurde das Pilzmaterial im Röhrchen gewogen und erneut mit steriler NaCl-Lösung versetzt. Dabei wurde pro 0,1g Pilz das Röhrchen auf 1ml aufgefüllt, so dass ein Pilz-NaCl-Gemisch mit einer Konzentration von 1:9 hergestellt wurde. Die so entstandene Pilzlösung enthielt somit keine Anteile eines Nährmediums mehr und konnte sowohl auf einer Agar-Platte ausgegossen als auch in ein flüssiges Nährmedium gegeben werden.

Vom gewaschenen Pilzmaterial wurden 0,5 g (entsprechen 0,1 g getrocknetem Myzel) pro 100 ml, also 5 ml des Pilz-NaCl-Gemischs in das flüssige Nährmedium gegeben und der Ansatz bei 24 °C auf dem Magnetrührer inkubiert. Auch hier handelt es sich bei den Mengenangaben um Erfahrungswerte, Vicher et. al. produzierten ein ähnliches Pilzhomogenat aus *Trichophyton rubrum* und einem Phosphat – Puffer, jedoch machten sie keine genauen Angaben zu Mengen oder Verhältnis (Vicher, Lyon et al., 1959). Dieser Ansatz wurde nachfolgend auch von Zussmann et. al. verwendet, sie benutzten für ihre Zwecke unterschiedliche Mengen (Zussman, Lyon, & Vicher, 1960).

Als Kontaminationskontrolle wurde stets eine Kultur auf Kimmig-Agar (Merck, Darmstadt, FRG) mitgeführt. Hierbei wurde immer etwas vom verwendeten Pilzmaterial auf eine Agar-Platte gebracht und täglich geprüft, ob der Ansatz möglicherweise mit Bakterien oder anderen Pilzen kontaminiert ist, die auf Kimmig-Agar (enthält keine Antibiotika) wachsen würden. Außerdem wurde auch immer etwas vom verwendeten Material auf eine Selektiv-Agar-Platte gebracht, um das Wachstum zu kontrollieren.

So wurde sichergestellt, dass das verwendete Pilzmaterial aus lebendem Mycel bestand und die Zellen während der Aufbereitung nicht zugrunde gegangen waren.

3.1.4 Testung auf Pigmentbildung

Die einzelnen Pilzstämme weisen häufig eine hohe Pleomorphie auf und unterscheiden sich somit oft in ihren Eigenschaften. Daher wurde vor Beginn der Versuche zur Pigment-Produktion die oben genannten Wildstämme und CBS-Stämme sowie 34 Wildstämme von *Trichophyton rubrum* auf festem 1b-Medium auf ihre Pigmentproduktion getestet, so dass für die Versuche Stämme mit einer möglichst ausgeprägten Pigmentproduktion verwendet werden konnten.

Das Medium enthielt Tryptophan als Stickstoffquelle, da es in unseren Versuchen die besten Ergebnisse bezüglich auf die Produktion von Pigment erzielte. Aus dem entsprechenden Pilzmyzel wurden mit einer 3 mm–Stanze 6 Stücke ausgestanzt und auf eine Agar-Platte mit festem 1b-Agar verimpft. Die Platten wurden dann mindestens 4 Wochen bei 24 °C bebrütet und anschließend anhand der Tiefe der Braunfärbungen die Pigmentproduktion semiquantitativ optisch miteinander verglichen.

3.1.5 Tryptophan als Stickstoffquelle

Für alle weiteren Versuche wurde ein flüssiges 1b-Medium mit Tryptophan als Stickstoffquelle verwendet, da es in unseren Versuchen die besten Ergebnisse bezüglich der Pigmentproduktion erzielte, so dass sich das Nährmedium nun wie folgt zusammensetzte (pro 100 ml Aqua dest.):

1 g Glukose

0,15 g Magnesiumsulfat

0,3 g Kaliumhydrogenphosphat

0,3 g Tryptophan

3.1.6 Zeitabhängigkeit

Um die Abhängigkeit der Xanthomegninbildung von der Bebrütungsdauer zu untersuchen, wurden mit verschiedenen Kulturansätzen Zeitreihen über 10 Tage durchgeführt. Dazu wurden jeweils 500 ml des flüssigen 1b-Mediums hergestellt und das entsprechende Pilzmaterial hinzu gegeben. Nun wurden 10 Tage lang täglich unter sterilen Bedingungen jeweils 50 ml von der Kultur abgenommen und extrahiert wie unten beschrieben, außerdem wurde von jedem Abstand der pH-Wert gemessen.

3.1.7 pH-Abhängigkeit und Pilzwachstum

Um die Abhängigkeit der Xanthomegninproduktion vom pH-Wert des Nährmediums zu untersuchen, wurden 6 Kulturen zur Pigmentbildung angesetzt, die auf verschiedene pH-Werte gepuffert wurden. Kultur 1 stellte dabei einen herkömmlichen Ansatz mit flüssigem 1b-Medium dar. Zur Pufferung der Kulturen wurde ein 1/15 molarer Phosphatpuffer verwendet, bestehend aus Monokaliumphosphat und Dinatriumphosphat (nach Sörensen).

Die Pufferlösungen wurden wie folgt angesetzt:

A	B
Monokaliumphosphat (KH_2PO_4)	Dinatriumphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
MG = 136,09	MG = 177, 99
1/15 M = 9,073 g/L	1/15 M = 11,87 g/L

Zur Herstellung von Lösung A wurden also 9,073 g KH_2PO_4 in 1 Liter Aqua dest. , zur Herstellung von Lösung B 11,87 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 1 Liter Aqua dest. gegeben.

Der Versuch wurde als Zeitreihe durchgeführt, jeder der 6 Kolben enthielt 500 ml des 1b-Glukose-Nährmediums mit Tryptophan als Stickstoffquelle, wobei der Wasser- und Salzanteil des Mediums hier durch die Pufferlösungen ersetzt wurde.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Kulturen zur pH-Wert-Untersuchung

	pH-Wert	A	B	
Kultur 1	4,7	-	-	herkömmliches 1b-Medium
Kultur 2	4,8	500 ml	-	
Kultur 3	5,0	496 ml	4 ml	
Kultur 4	5,5	478 ml	22 ml	
Kultur 5	6,0	444,5 ml	55,5 ml	
Kultur 6	6,5	370 ml	130 ml	

Jeder Ansatz wurde mit einem Feuchtgewicht von 2,5 g (0,5g/100ml) des gewaschenen Pilzes versehen und 10 Tage lang bei 24 °C inkubiert, wobei hier Tag 1 als der Tag des Ansetzens der Kultur bezeichnet wird. Von Tag 1 an wurde nun von jeder Kultur 50 ml steril entnommen und zunächst der pH-Wert gemessen. Um das Wachstum des Pilzes zu untersuchen, wurde dann jeder Abstand durch je ein vorher gewogenes Rundfilterpapier gefiltert, so dass das Pilzmaterial im Filter hängen blieb, während die pigmentierte Kulturflüssigkeit wieder aufgefangen wurde. Die Filter wurden über Nacht getrocknet und dann erneut gewogen, so dass das in 50 ml enthaltene Trockengewicht des Pilzes näherungsweise ermittelt werden konnte. Eine komplette Trennung des Pilzes durch Abzentrifugation konnte selbst bei hohen Drehzahlen (bis 4000g) und langer Zentrifugationsdauer nicht gelingen, da sofort nach der Zentrifugation wieder Anteile des Pilzmyzels im Nährmedium hochstiegen und eine Abpipettierung von reinem Nährmedium somit nicht möglich war.

Die so von Pilzmaterial befreiten Flüssigkulturen konnten dann zur weiteren Extraktion der Farbstoffe verwendet werden, zuvor wurden sie aber zur einheitlichen Extraktion mittels HCl alle auf einen pH-Wert von 4,7 (entsprechend dem pH-Wert der ursprünglichen Kultur) eingestellt, da die Pigmentextraktion mit Ethylacetat im sauren Milieu besser gelingt, schon ab einem pH-Wert von 5,5 wird deutlich weniger Pigment vom Ethylacetat aufgenommen.

3.2 Gewinnung des Rohextraktes

3.2.1 Gewinnung des Rohextraktes aus festem 1b-Agar

Nach mindestens 4-wöchiger Inkubation wurde der Inhalt der Platten (pigmentierter Agar und darauf gewachsener Pilz) mittels Pürierstab (Quelle, Fürth, FRG) homogenisiert und über 24 h in Ethylacetat (Merck) ausgezogen. Die Trennung fester Bestandteile vom in der Ethylacetatphase gelösten Pigment erfolgte durch Filtration über Glaswolle. Das filtrierte Extrakt wurde mit einem gleichen Volumen Aqua dest. versetzt und gut durchmischt. Die dabei entstehenden drei Phasen (Wasserphase, schaumige Phase mit Tween und Agarresten, Ethylacetatphase mit Pigment) wurden im Scheidetrichter voneinander getrennt. Die pigmenthaltige Ethylacetatphase wurde im Rotationsverdampfer (Typ VVI, Heidolph-Elektro KG, Kehlheim) getrocknet und anschließend in Methanol (Merck) aufgenommen. Die lichtgeschützte Lagerung erfolgte in Autosamplern bei -20°C bis zur weiteren Aufreinigung der Pigmente.

3.2.2 Gewinnung des Rohextraktes aus flüssigem Nährmedium

Nach der Inkubation wurde die jetzt pigmentierte flüssige Kultur im Erlenmeyerkolben mit Ethylacetat versetzt und eine Stunde lang erneut gerührt, so dass sich das Pigment im Ethylacetat ansammeln konnte. Die so entstandene pigmentierte Ethylacetat-Phase wurde anschließend von der den Pilz enthaltenden Wasser-Phase abpipettiert und wie oben beschrieben getrocknet und aufbewahrt.

3.3 Dünnschichtchromatographie

3.3.1 Analytische Dünnschichtchromatographie

Um die einzelnen Pigmente und vor allem das Xanthomegnin aus dem Rohextrakt aufzutrennen und darzustellen, wurde zunächst die Dünnschichtchromatographie angewendet. Verwendet wurde hierfür ein Linomat IV (CAMAG, Muttenz, Schweiz) und eine 100 μl Hamilton-Spritze (Linomat-Syringe, Camag), mit deren Hilfe jeweils 10-20 μl des Rohextrakts auf Dünnschichtplatten (Kieselgel 60, 20x20, Merck) aufgetragen wurden. Hierfür wurde der Linomat wie folgt eingestellt:

Tabelle 6: Einstellung des Linomaten zur analytischen Dünnschichtchromatographie

Plattenbreite	200 mm
Bandbreite	10 mm
Auftragungsgeschwindigkeit	8 sec/ μ l
Startposition	23 mm
Abstand der Banden	10 mm
Aufzutragendes Volumen	10-20 μ l*
Druck Hauptventil	<100 bar
Druck Reduzierventil	4-5 bar

* Abhängig von Konzentration und Konsistenz des Rohextraktes

Zur Entwicklung der Platten wurde nach der Methode von Gill und Steglich (Gill, 1987) ein Laufmittel mit der Zusammensetzung Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure im Verhältnis 10:5:3 verwendet.

Nach Entwicklung und Trocknung der Platten wurden die Ergebnisse mittels einer Canon Power Shot G5 sowohl im Tageslicht als auch unter UV 366 bzw. UV 254 fotografiert. Das zugehörige Programm Wincats ermöglicht eine standardisierte Methode zum Vergleich und zur Dokumentation der Ergebnisse, zudem kann mit Hilfe des Programms eine sofortige Bestimmung des R_f-Wertes einzelner Banden vorgenommen werden.

3.3.2 pH-Stabilität der Substanzen

Um die pH-Stabilität der Substanzen zu prüfen, wurden die Platten sowohl mit rauchender Salzsäure (37%, Merck) als auch mit Ammoniak (33%, reinst., Merck) bedampft, indem zunächst mit einer Glaspipette die Dämpfe über den Salzsäure- bzw. Ammoniak-Gefäßen aufgenommen und dann dicht über der Dünnschichtplatte abgegeben wurden. Dieser Vorgang wurde einige Male wiederholt, damit ein eventueller Farbumschlag deutlich sichtbar wurde, dann wurde die Platte erneut mit WinCats fotografiert.

3.3.3 Präparative Dünnschichtchromatographie

Um die einzelnen Bestandteile und hier vor allem den Farbstoff Xanthomegnin weiter aufzureinigen, wurden 350-450 µl des gewonnenen Rohextraktes über eine breite Bande auf die Kieselgelplatte aufgetragen, die Einstellung des Linomaten ist in folgender Tabelle dargestellt:

Tabelle 7: Einstellung des Linomaten zur präparativen Dünnschichtchromatographie

Plattenbreite	200 mm
Bandbreite	165 mm
Auftragungsgeschwindigkeit	4 sec/µl
Startposition	20 mm
Abstand der Banden	0 mm
Aufzutragendes Volumen	350 - 400 µl*
Druck Hauptventil	<100 bar
Druck Reduzierventil	4-5 bar

* Abhängig von Konzentration und Konsistenz des Rohextraktes

Zur Entwicklung der Platte wurde hier das TEA-Laufmittel in der Konzentration 10:5:2 verwendet, die Banden ließen sich hiermit sauberer auftrennen als mit der vorher verwendeten Konzentration 10:5:3.

Nach Trocknen der Platte wurde dann die gelb erscheinende Bande mit dem R_f-Wert 0,26 (identifiziert durch einen mitgelaufenen Xanthomegnin-Standard, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Universität Hohenheim, Forschungsgruppe Lauber) mit Hilfe eines Skalpell herausgekratzt und die so erhaltene Mischung aus Pigment und Kieselgel mit dem Mörser fein zermahlen. Um nun das Pigment vom Kieselgel zu trennen, wurde das Pulver im Verhältnis 1:1 mit Ethylacetat und Aqua dest. geschüttelt, so dass sich eine Wasserphase und eine das Pigment enthaltene Ethylacetatphase bildeten. Die pigmentierte Phase wurde dann abpipettiert, durch Zugabe von Natriumsulfat (Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz) wurde noch eventuell vorhandenes freies Wasser gebunden. Anschließend wurde die Lösung 5 Minuten bei 4000g zentrifugiert (Hettich Zentrifuge, Rotana RP), und die so vom Natriumsulfat getrennte Ethylacetatphase mit enthaltenem Pigment in 4 ml-Autosamplern unter Stickstoffstrom in einem Heizblock (Techne DRI-Block D3, Thermo Dux, Heidelberg) bei 40°C getrocknet und bei -20°C gelagert.

3.3.4 Densitometrie

Um das gebildete Xanthomegnin quantifizieren zu können, wurde eine densitometrische Analyse mit Hilfe eines Camag TLC Scanner 2 (Camag, Muttenz, Switzerland) durchgeführt, der bei der klinischen Forschungsgruppe „Respiratorische Insuffizienz“ (Prof. Seeger) genutzt werden konnte. Der Scanner bestimmt die optische Dichte der Substanz auf der Dünnschichtplatte und integriert selbständig die Fläche unter den einzelnen Messpeaks.

Für die Analyse wurde wie oben beschrieben eine Zeitreihe mit *T.rubrum* über 10 Tage erstellt, das heißt unter Verwendung des flüssigen Nährmediums mit Tryptophan (0,3 g/100ml), pH 4,7, Probenentnahme im Abstand von 24 Stunden.

Analysiert wurde eine Dünnschichtplatte, auf die je 15 µl der Rohextrakte aufgetragen wurden.

Zusätzlich erfolgte noch die Applikation von vier Proben eines Xanthomegnin-Standards, erhalten aus der Forschungsgruppe Lauber der Universität Hohenheim, von denen 10, 20, 30 und 40 µl aufgetragen wurden, 10 µl enthielten hierbei 10 µg Xanthomegnin.

Durch Mitführen dieser Standardprobe konnte eine platteninterne Eichung erfolgen sowie die Absolutwerte in µg errechnet werden.

3.4 HPLC

3.4.1 Analytische HPLC

Mit Hilfe der analytischen reversed-Phase-HPLC wurde die vorgereinigte Substanz auf ihre Reinheit überprüft. Es wurde eine Merck-Hitachi-Anlage (L-3000 Multi Channel Photodetektor mit L-6200A-Pumpe) mit einer RP8-Säule verwendet. Der Flow betrug 1ml/min bei einem Druck von 140-160 Bar und einer Detektorempfindlichkeit von 0,3.

Die mobile Phase bestand aus 50 mmol Phosphatpuffer (pH 6,85, Merck) und Acetonitriol (Merck). Es erfolgte eine Entgasung der beiden Phasen mittels eines Suppelco Filtrationsapparates 2 (Suppelco, Bellefonte, USA), versehen mit einem Nylon 66-Filter.

Zur Erzielung einer guten Trennung der Einzelsubstanzen wurde die Analyse zunächst mittels eines Gradienten durchgeführt, der sich wie folgt aufbaut: Beginn mit 15% Acetonitril (Elution polarer Substanzen), dann Steigerung auf 60% innerhalb 25 Minuten, Halten der Konzentration für 10 Minuten, dann Absenken der Konzentration innerhalb 5 Minuten auf 15% Acetonitril, wo sie für weitere 15 Minuten verbleibt.

3.4.2 Präparative HPLC

Zur weiteren Aufreinigung des Xanthomegnins wurde die präparative HPLC unter isokratischen Bedingungen durchgeführt. Der in der analytischen HPLC verwendete Phosphatpuffer wurde hier durch entgastes HPLC-Wasser (Merck) ersetzt, um zu verhindern, dass aus dem Phosphatpuffer stammende Salze die Aufreinigung der Substanz stören.

Für die präparative HPLC wurde eine Lichrospher 100–Rp8 (10µm)–Säule auf einem Gilson-Modell 302 (Gilson, USA) und einem 802-Modul verwendet. Um die präparative Säule nicht zu überlasten, betrug der Flow 6,25 ml/min.

Die einzelnen Peaks der Substanz wurden bestimmt und in mit 96%igem Ethanol gereinigten Erlenmeyerkolben aufgefangen. Das Acetonitril wurde dann bei 30°C im Rotationsverdampfer abgezogen und die so im Kolben verbleibende Wasserphase mit der Substanz wurde unter ständigem Drehen über Trockeneis/Isopropanol eingefroren. Bis zur vollständigen Trocknung wurde die Substanz lyophilisiert (Lyovac GT2).

3.5 Strukturaufklärung

Die Aufklärung von Summen- und Strukturformel der aufgereinigten Substanz erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für organische Chemie und Biochemie II der TU München (Dr. P. Spiteller), wo die aus Gießen erhaltenen Proben mittels ^1H - und ^{13}C -NMR (600 MHz) analysiert wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Pigmentbildung

4.1.1 Bildung von Pigment durch *Trichophyton rubrum* mit verschiedenen Stickstoffquellen

4.1.1.1 Aminosäuren

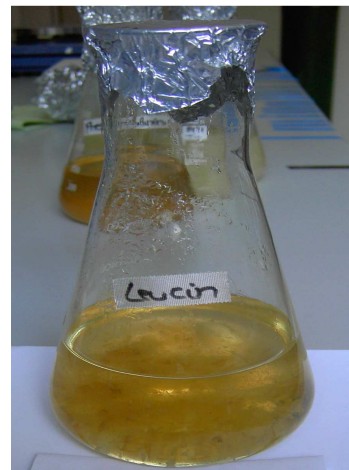
Bei der Verwendung der verschiedenen Aminosäuren im Nährmedium stellte sich heraus, dass in Kulturen, die Tryptophan enthielten, wesentlich mehr Pigment produziert wurde als in anderen Kulturen. Glycin, Alanin, Phenylalanin und Leucin brachten Braunfärbungen der Kulturen, die ab dem 6.-7. Tag zu erkennen waren, Serin und Valin ließen nur eine schwache Pigmentbildung ab Tag 10 beobachten. Die Kultur, die Threonin enthielt, entwickelte auch nach 25 Tagen Inkubation kein Pigment. Alle diese Kulturen wiesen also bis zur erkennbaren Pigmentbildung eine viel längere Inkubationszeit auf, als Kulturen, die Tryptophan enthielten. Die Kulturen enthielten jeweils denselben Pilzstamm und wurden alle parallel unter gleichen Umgebungsbedingungen inkubiert.



Phenylalanin

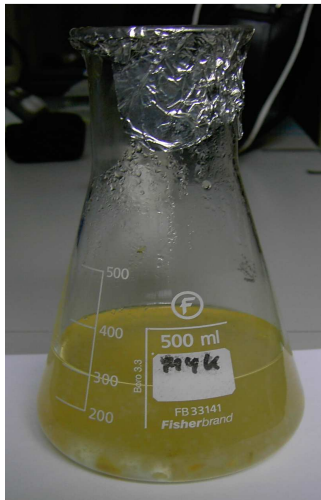


Glycin

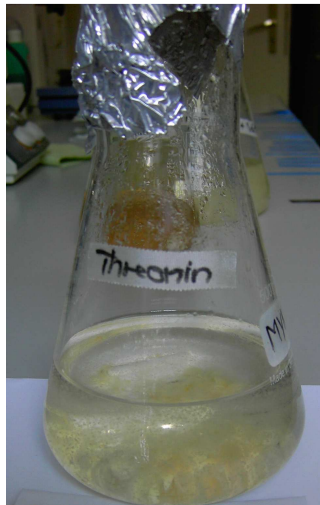


Leucin

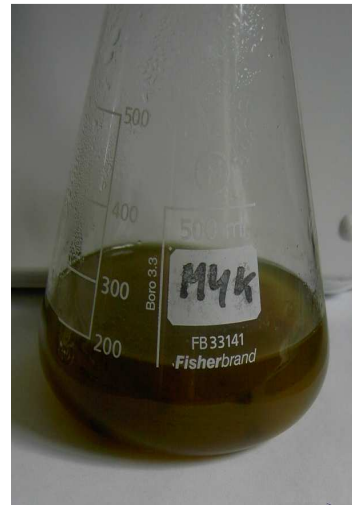
Abbildung 6: *T.rubrum* 53a in flüssigem 1b Medium mit verschiedenen Aminosäuren, 13 Tage inkubiert



Serin



Threonin

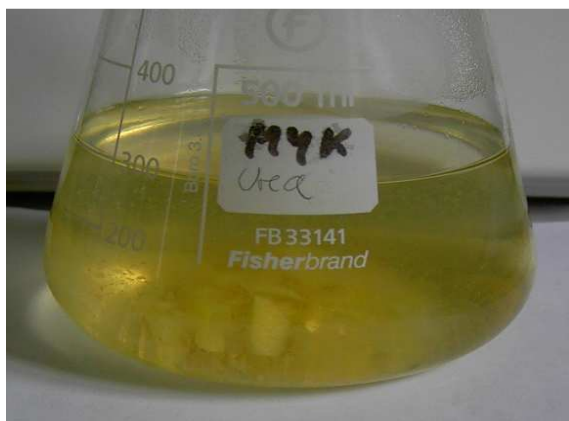


Tryptophan

Abbildung 6: *T.rubrum* 53a in flüssigem 1b Medium mit verschiedenen Aminosäuren, 13 Tage inkubiert

4.1.1.2 Andere Stickstoffquellen

Die Versuche mit Ammoniumsulfat und Urea erbrachten folgende Ergebnisse: Wurde Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle eingesetzt, so zeigte sich erst spät eine Gelbfärbung der Kultur, selbst nach 25 Tagen Inkubation stellte sich noch keine Braunfärbung ein. Bei der Verwendung von Urea konnte schon eine sehr frühe Gelbfärbung der Kultur festgestellt werden, allerdings nahm auch diese Kultur im Laufe der Zeit nicht die braune Farbe der Tryptophan-Kultur an.



1. Tag



4. Tag

Abbildung 7: 1b-Flüssigmedium mit Urea als Stickstoffquelle (Pilzalter 15 Tage)

4.1.2 Bildung von Pigment durch *Trichophyton rubrum* mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle

Die meisten Dermatophyten weisen schon bei Anzucht auf herkömmlichem Selektiv-Medium eine gewisse Pigmentierung in der Kultur auf (siehe Abbildung 1), es zeigte sich aber, dass die Pigmentbildung durch Zusatz von Tryptophan als einziger Stickstoffquelle im Nährmedium um ein Vielfaches gesteigert werden konnte.

4.1.2.1 Bildung von Pigment im festen 1b-Medium

Wurde Pilzmaterial in den wie oben beschrieben hergestellten 1b-Agar mit Tryptophan als Stickstoffquelle verimpft, so zeigte sich schon nach 6-7 Tagen eine beginnende Braunfärbung des Agars, der sich vorher farblos und transparent darstellte. Nach ca. 4-6 Wochen war keine Zunahme der Verfärbung mehr zu beobachten und die jetzt homogen braunen Kulturen konnten geerntet und zur weiteren Aufreinigung des Pigments verarbeitet werden.

4.1.2.2 Bildung von Pigment im flüssigen Nährmedium

Ein Vorteil der Verwendung von flüssigem 1b-Nährmedium ist unter anderem die schnellere Produktion des Pigments durch die Dermatophyten. Bei *Trichophyton rubrum* (ungewaschen) lässt sich schon nach 24 Stunden eine Verfärbung der Kultur beobachten, die zunächst eine gelben und dann einen rötlich-braunen bis braunen Farbton annimmt. Schon nach 5 Tagen ist optisch keine Zunahme der Pigmentproduktion mehr festzustellen.



1. Tag



4.Tag

Abbildung 8: *T.rubrum* (ungewaschen, Alter: 15 Tage) in flüssigem 1b-Medium mit Tryptophan:

Beim gewaschenen *Trichophyton rubrum*, der 3 Tage lang in flüssigem Selektivmedium gewachsen ist, zeigt sich die Pigmentbildung etwas verzögert, lässt sich aber dennoch deutlich beobachten, wie die folgende Abbildung zeigt. Der gewaschene Pilz scheint also im Gegensatz zu dem Myzel, an dem noch Reste von Agar heften, zunächst etwas Zeit zu brauchen, um seine Stoffwechsel zu aktivieren, er muss seine Energie allein aus dem 1b-Medium ziehen.



1. Tag



4.Tag

Abbildung 9: *T.rubrum* (gewaschen, Alter: 3 Tage) in flüssigem 1b-Medium mit Tryptophan

4.1.2.3 Pigmentbildung im Difco-Nährmedium

Das verwendete Difco-Nährmedium, das außer Glukose noch zahlreiche Spurenelemente und für das Pilzwachstum wichtige Nährstoffe enthält, erwies sich bei der Pigmentproduktion von *Trichophyton rubrum* gegenüber dem 1b-Nährmedium als gleichwertig. Bei gleicher Stammkultur und paralleler Inkubation unter gleichen Umgebungsbedingungen ließen sich keine nennenswerten Unterschiede in der Färbung der Medien erkennen (siehe Abbildung).



Difco-Medium



1b-Medium

Abbildung 10: Pigmentbildung von *Trichophyton rubrum* 53a in Difco- und in 1b-Medium (jeweils mit Tryptophan, 1. Tag)

4.1.2.4 Pigmentbildung in Abhängigkeit des Pilzalters

Auf festem Selektiv-Agar angezüchteter *Trichophyton rubrum* zeigte ab einem Alter von ca. 3 Wochen eine verspätete und geringere Pigmentbildung in den flüssigen Kulturen als ein jüngerer Pilz, wie die folgende Abbildung verdeutlicht.



Pilzalter 15 Tage



Pilzalter 22 Tage

Abbildung 11: Einfluss der Pilzalters auf die Pigmentbildung (1b-Medium mit Tryptophan, 1. Tag)

Auch bei in flüssigem Medium angezüchteten Pilzmaterial lässt sich dieses Phänomen beobachten, schon bei einem Alter der Primärkultur von 7 Tagen zeigt sich die Pigmentproduktion deutlich eingeschränkt.



Alter der Primärkultur 3 Tage



Alter der Primärkultur 7 Tage

Abbildung 12: *T.rubrum* gewaschen in flüssigem 1b-Medium, 4 Tage inkubiert

Dieser Versuch wurde noch zwei weitere Male mit unterschiedlichen Kulturen von *T.rubrum* 53a wiederholt und erzielte entsprechende Ergebnisse, so dass ein zufälliges Auftreten des Phänomens weitgehend ausgeschlossen werden kann.

4.1.3 Bildung von Pigment durch andere Dermatophyten

Auch die meisten anderen untersuchten Dermatophyten zeigten eine mehr oder minder ausgeprägte Pigmentbildung mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle, mit Ausnahme von *Epidermophyton floccosum*, bei dem sowohl im festen als auch im flüssigen Medium auch nach wochenlanger Inkubation keine Pigmentbildung zu beobachten war. Die Wachstumskontrolle auf Selektiv-Agar für pathogene Pilze fiel positiv aus, das heißt, es handelte sich hierbei um lebende Zellen. Zudem zeigten auch die extra für diese Zwecke aufgekauften Referenzstämme des CBS von *T.rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. soudanense*, *T.violaceum*, *M. canis* und *E. floccosum* wenig oder keine Pigmentproduktion, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass diese Kulturen sehr pleomorph waren. Für weitere Untersuchungen wurden daher die Wildstämme verwendet, die sowohl makro- als auch mikroskopisch identifiziert wurden.

Tabelle 8: Pigmentproduktion der einzelnen Dermatophyten im flüssigen 1b-Medium, 7 Tage inkubiert

<i>T. rubrum</i>	CBS 301.60	+
	Wildstamm 53a	+++
	Wildstamm 134b	+++
<i>T. rubrum</i> var. <i>granulare</i>	Wildstamm 1612/04	+++
<i>T. equinum</i>	Wildstamm 953	+
<i>T. mentagrophytes erinacei</i>	Wildstamm 1830/04	+
<i>T. gallinae</i>	Wildstamm 1374	+
<i>T. megninii</i>	Wildstamm 831	++
<i>T. mentagrophytes</i>	CBS 318.56	+
	Wildstamm 81c	+
	Wildstamm 1425/03	+
<i>T. schoenleinii</i>	Wildstamm 34a	+
<i>T. soudanense</i>	Wildstamm 26a	++
<i>T. tonsurans</i>	CBS 419.52	-
	Wildstamm 156b	++
<i>T. verrucosum</i>	CBS 562.50	-
	Wildstamm 132/03	+
<i>T. violaceum</i>	CBS 453.61	+
	Wildstamm	++
<i>M. canis</i>	CBS 113480	+
	Wildstamm 1245	++
<i>M. cookei</i>	Wildstamm 67b	++
<i>E. floccosum</i>	CBS 214.63	-
	Wildstamm 1635/04	-

4.2 Dünnschichtchromatographische Versuche

4.2.1 Analytische Dünnschichtchromatographie

Die einzelnen Pigmentkomponenten aus den erhaltenen Rohextrakten ließen sich mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten gut auftrennen, so dass eine vorherige Säulenchromatographie des Pigments nicht notwendig war. Ein typisches Bandenmuster von *Trichophyton rubrum* (4 Tage im flüssigen Medium inkubiert) ist in Abbildung 13 dargestellt, die Dünnschichtplatte wurde hier mit WinCats sowohl bei Tageslicht als auch unter UV-Licht 366 nm fotografiert. Dieser Versuch wurde drei Mal wiederholt, auch unterschiedliche Stämme wurden untersucht. Tabelle 9 zeigt eine Auflistung der einzelnen Banden mit den zugehörigen Rf-Werten.

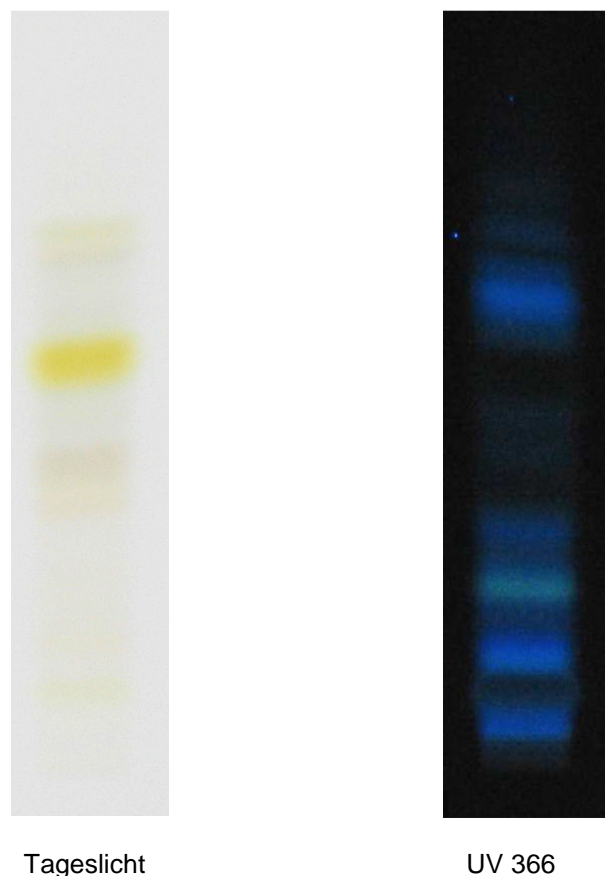


Abbildung 13: Dünnschichtchromatographie *T.rubrum* 134b gewaschen, 4 Tage inkubiert, pH 4,7

Tabelle 9: Rf-Werte und Farben des Dünnschichtchromatogramms von *Trichophyton rubrum*

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,17 - 0,24	lila
	0,25	schwach gelb
	0,27-0,30	lila
	0,31	dunkel-lila
	0,33	blass-gelb
	0,38	rosa
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,07	blau
	0,12	blau-grün
	0,17	blau
	0,31	blau
	0,33	blau
	0,34	blau
	0,54	blau

Besonders auffällig im Bandenmuster von *Trichophyton rubrum* ist die gelbe Bande mit dem Rf-Wert 0,23-0,26.

Um den Verdacht zu erhärten, dass es sich hierbei um das schon bekannte, unter anderem von einigen Dermatophyten produzierte Mykotoxin Xanthomegnin (Blank, Day, & Just, 1963) handeln könnte, wurde ein Xanthomegnin-Standard, der von der Universität Hohenheim zur Verfügung gestellt wurde, zusammen mit einer Probe des *Trichophyton rubrum*-Rohextraktes auf die Dünnschichtplatte aufgetragen und entwickelt. Hierbei zeigte sich, dass der Xanthomegnin-Standard und die zu untersuchende Bande auf exakt der gleichen Höhe liefen und auch optisch die gleiche gelbe Farbe aufwiesen, wie in Abbildung 13 dargestellt. Zudem zeigten die Banden auch gleiches Verhalten bei pH-Änderung durch Bedampfen mit Salzsäure und Ammoniak: Letzteres führte bei beiden Banden zu einem Farbumschlag von gelb ins bräunlich-violette, dieser ließ sich jedoch nicht durch Bedampfen mit Salzsäure wieder rückgängig machen.



Abbildung 14: *T.rubrum* im Vergleich mit Xanthomegnin – Standard (links)

Auch das Rohextrakt der anderen Dermatophyten ließ sich gut mittels präparativer Dünnschichtchromatographie auftrennen, hierbei zeigte sich, dass das Bandenmuster einiger Arten dem von *Trichophyton rubrum* sehr ähnlich sah, andere hingegen unterschieden sich deutlich davon. Diese Versuche wurden noch ein weiteres Mal mit gleichem Ergebnis wiederholt. Die folgenden Abbildungen zeigen die chromatographischen Ergebnisse der untersuchten Dermatophytenarten, bei Tageslicht fotografiert.

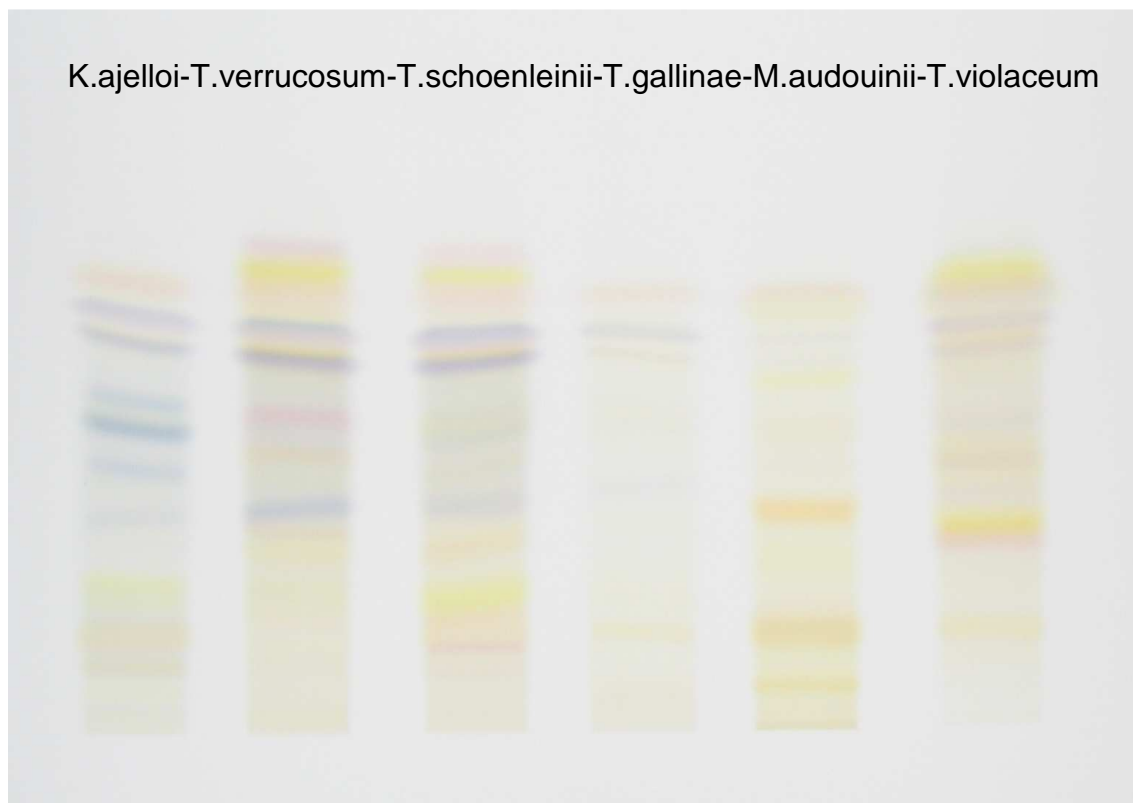


Abbildung 15: Dünnschichtchromatographische Bandenmuster der Dermatophyten I

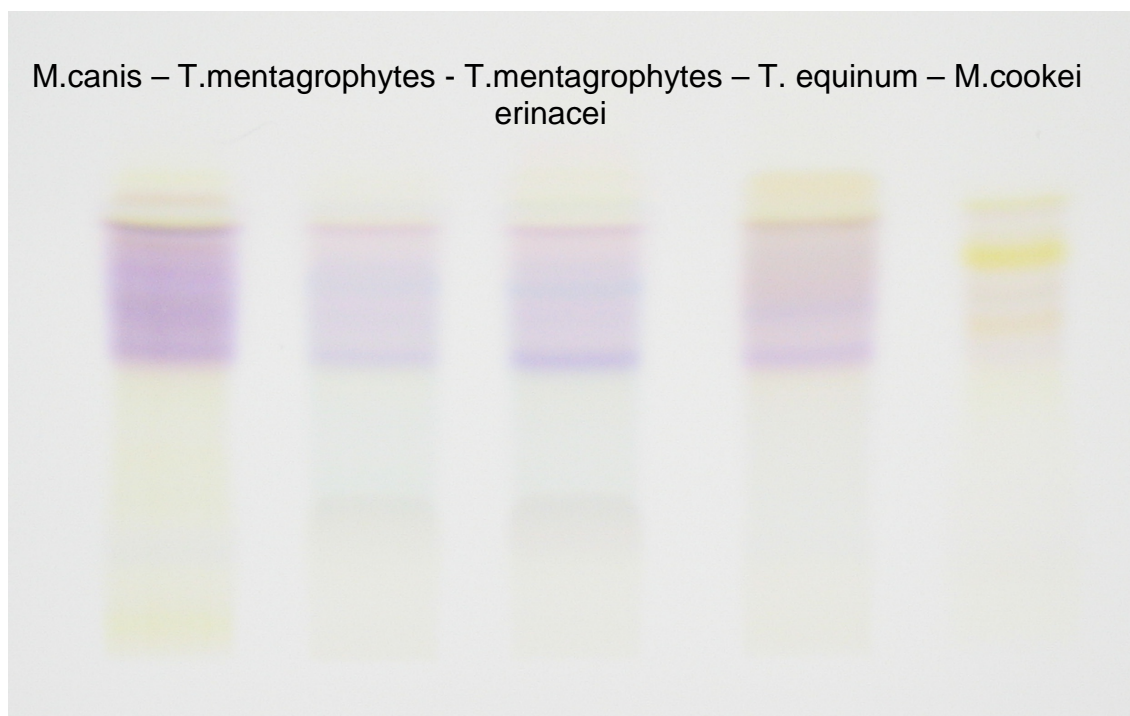


Abbildung 16: Dünnschichtchromatographische Bandenmuster der Dermatophyten II

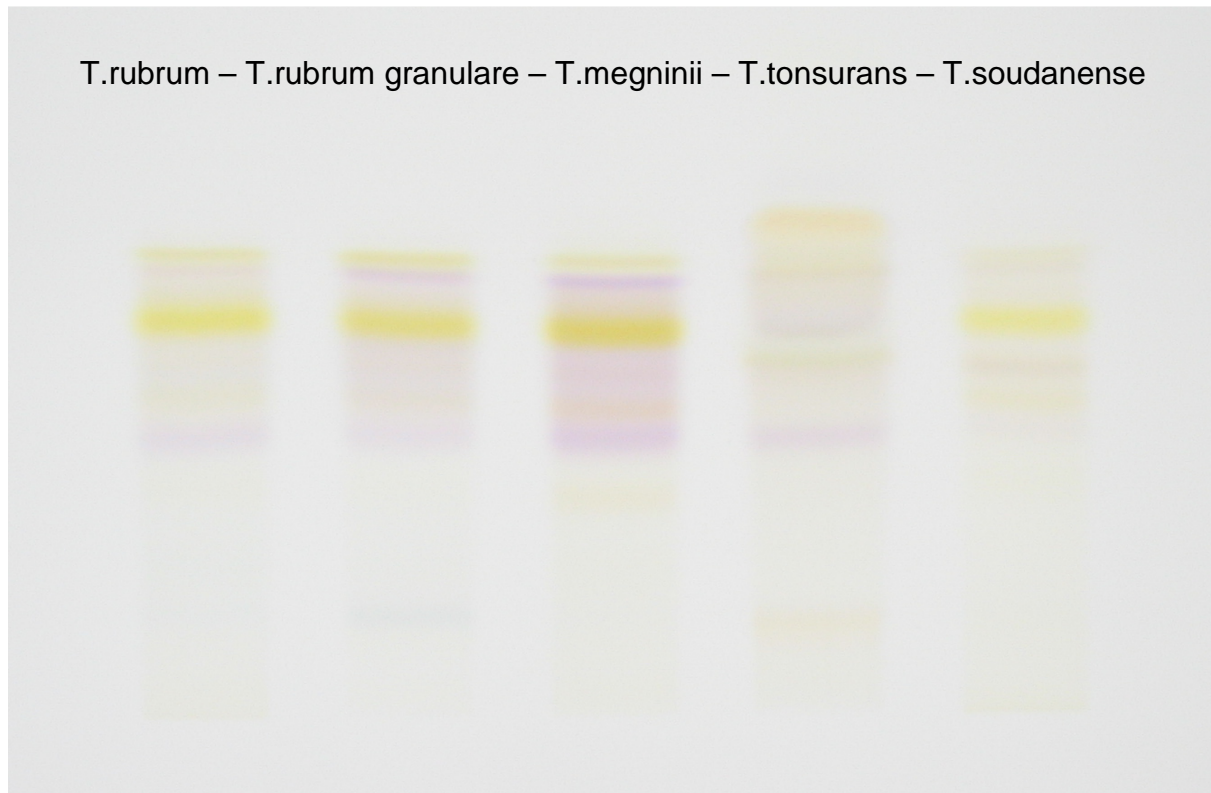


Abbildung 17: Dünnschichtchromatographische Bandenmuster der Dermatophyten III

Den Abbildungen ist zu entnehmen, dass nicht nur *Trichophyton rubrum*, sondern auch andere Dermatophyten die gleiche gelbe Bande aufweisen, und zwar *Mikrosporum cookei*, *Trichophyton rubrum granulare*, *Trichophyton megninii* und *Trichophyton soudanense*. Die Rohextrakte der drei Letztgenannten wurden hier erneut zusammen mit dem Xanthomegnin - Standard aufgetragen und entwickelt, mit dem Ergebnis, das auch hier die gelbe Bande aller Proben auf gleicher Höhe lief.

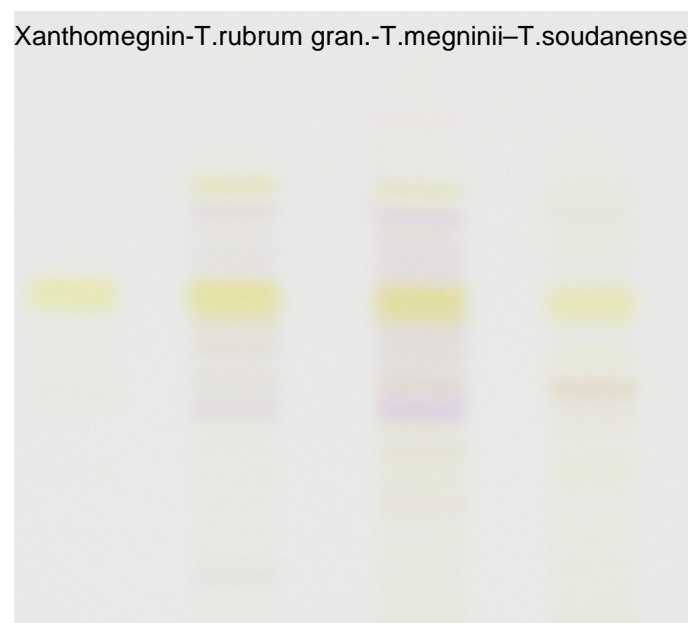


Abbildung 18: Vergleich einiger Proben mit Xanthomegnin – Standard

4.2.2 pH-Stabilität der Substanzen

Wurden die entwickelten Kieselgelplatten nach der Trocknung mit rauchender Salzsäure bedampft, so zeigte sich optisch keine bedeutende Änderung im Bandenmuster der Proben, wie unten abgebildet.

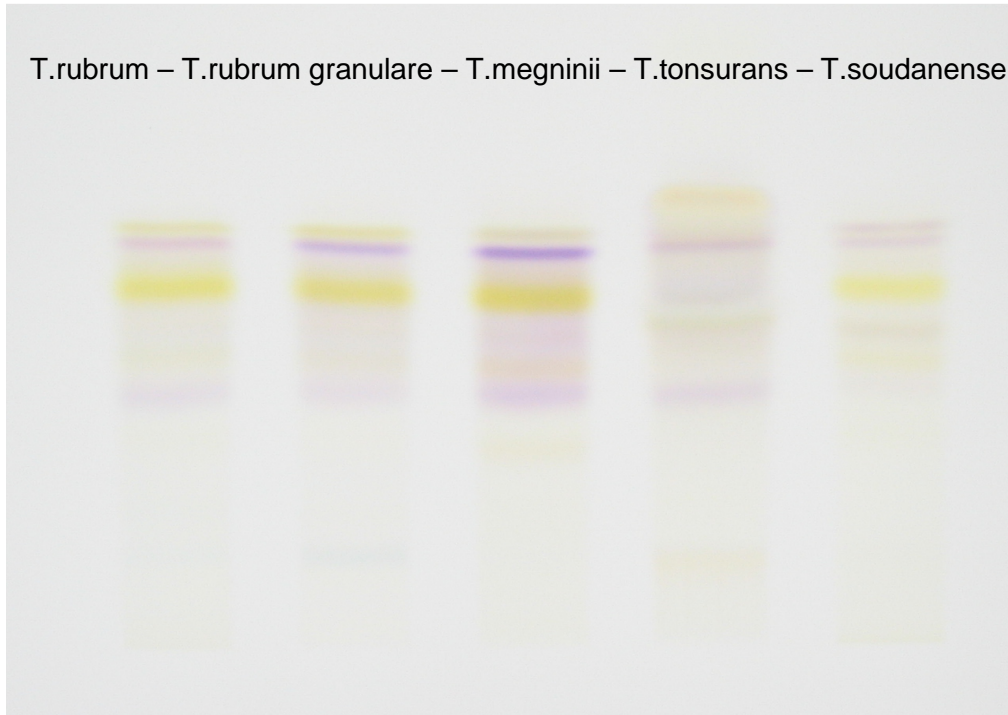


Abbildung 19: Dünnschichtplatte nach Derivatisierung mit HCl bei Tageslicht

Bei Derivatisierung mit NH_3 jedoch verfärbte sich die gelbe Bande deutlich in Richtung eines rot-violetten Farbtons.

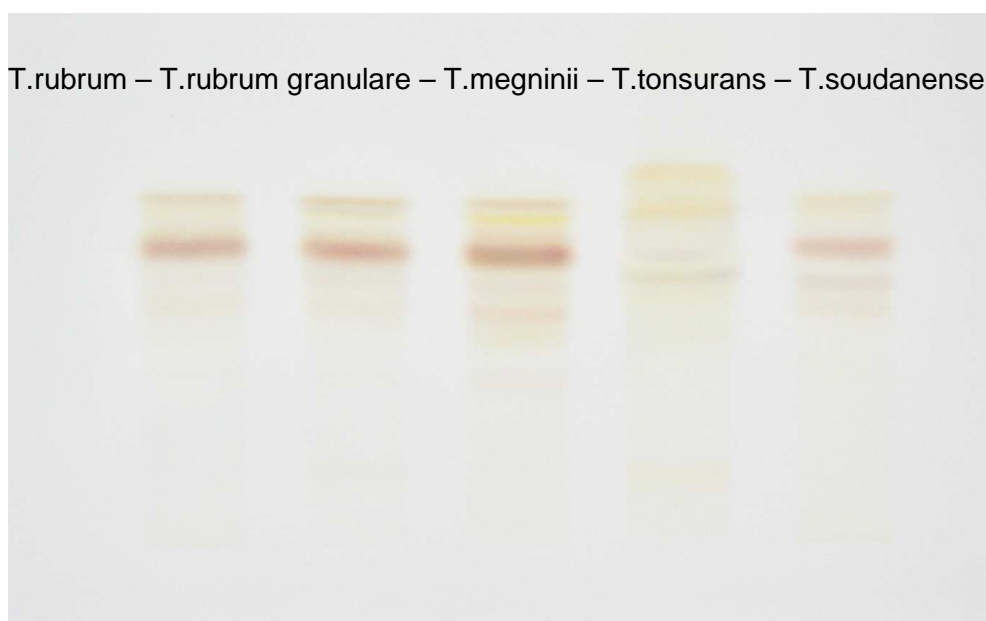


Abbildung 20: Dünnschichtplatte nach Derivatisierung mit NH_3 bei Tageslicht

4.2.3 Zeitabhängigkeit der Xanthomegnin-Produktion

Beim Auftragen der Rohextrakte einer Zeitreihe mit *Trichophyton rubrum* 53a (je 15 µl) stellte sich eine makroskopisch erkennbare Zunahme und auch wieder Abnahme der Intensität der gelben Xanthomegnin-Bande heraus, die zugunsten von blau erscheinenden Metaboliten oberhalb und unterhalb der Bande immer schwächer wird. Diese Zeitreihe wurde insgesamt drei Mal durchgeführt und zeigte jedesmal das oben beschriebene Phänomen. Die Zeitabhängigkeit der Xanthomegninproduktion (Abbildung 20) ließ sich auch in der Densitometrie feststellen (siehe densitometrische Ergebnisse).

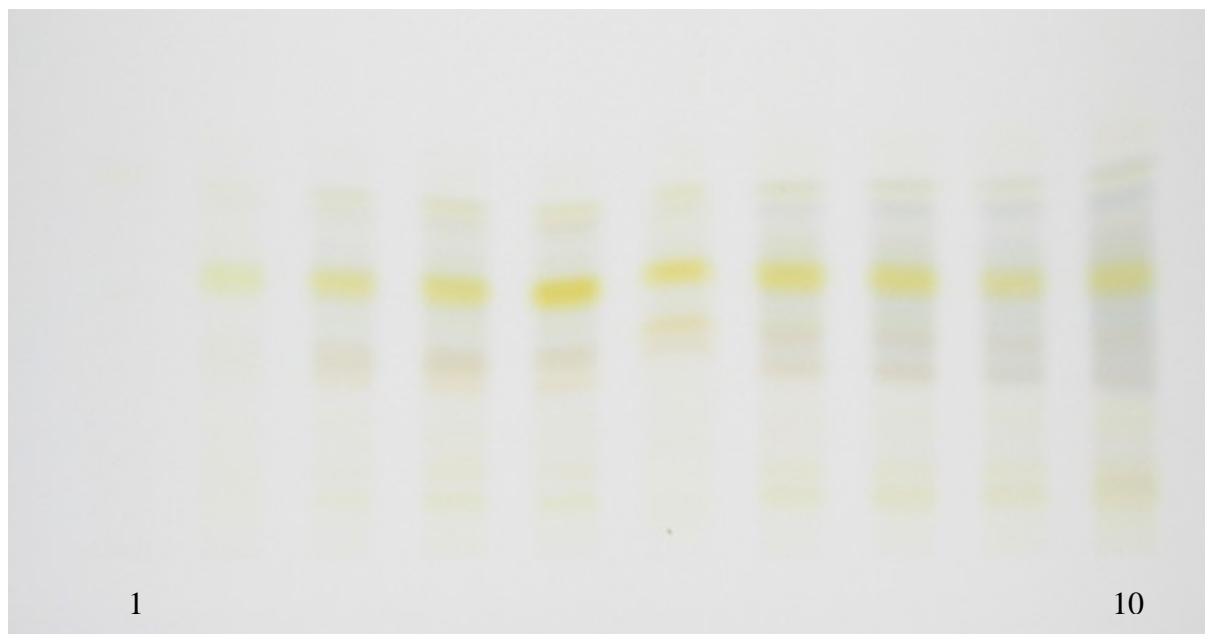


Abbildung 21: Zeitreihe Tag 1-10 (Tag 1 = Tag des Ansetzens der Kultur) ,
T.rubrum gewaschen, Aufnahme bei Tageslicht

4.2.4 Abhängigkeit der Xanthomegnin-Produktion vom pH-Wert des Nährmediums

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit wurden sechs Kulturen mit jeweils unterschiedlichen pH-Werten angesetzt und Zeitreihen durchgeführt. Der Versuch wurde zur Verifizierung noch ein weiteres Mal wiederholt. Das Ergebnis zeigte eine deutliche Abnahme der Xanthomegnin-Produktion des Pilzes. Je höher der pH-Wert des Nährmediums, desto schneller verschwand die gelbe Bande im Chromatogramm.

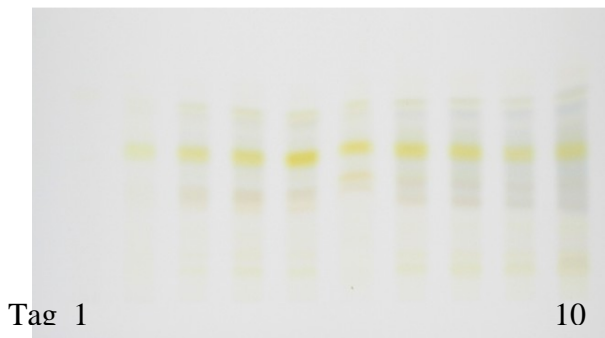


Abbildung 22: Kultur 1 – pH 4,7

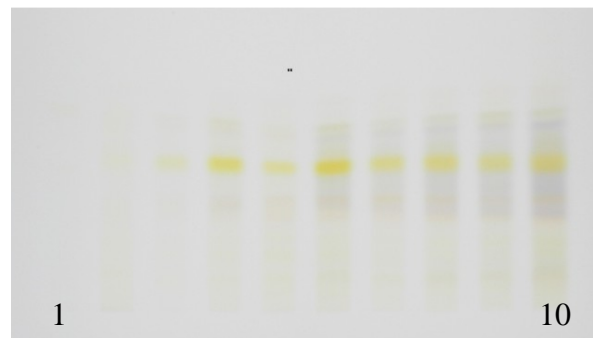


Abbildung 23: Kultur 2 – pH 4,8

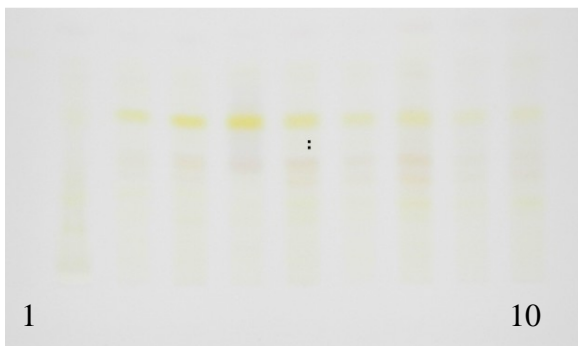


Abbildung 24: Kultur 3 – pH 5,0

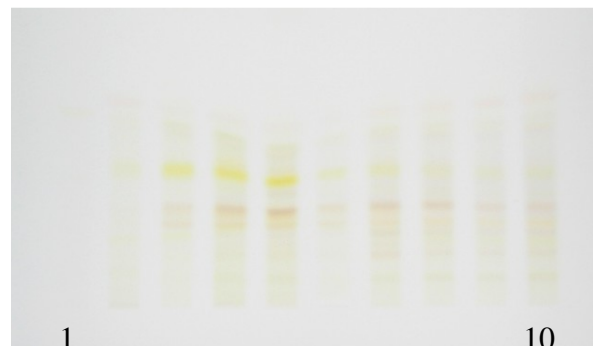


Abbildung 25: Kultur 4 – pH 5,5

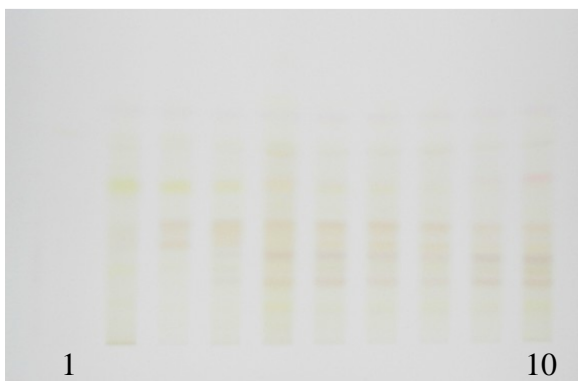


Abbildung 26: Kultur 5 – pH 6,0

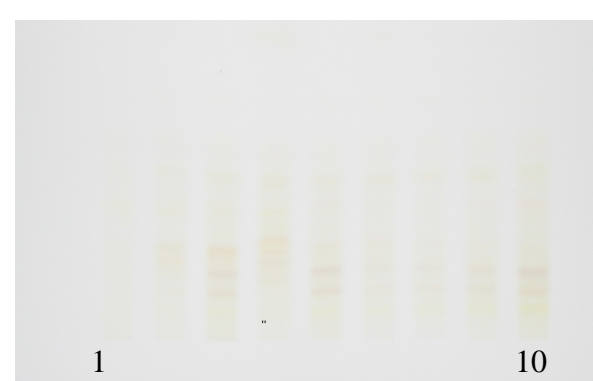


Abbildung 27: Kultur 6 – pH 6,5

Wie aus den Abbildungen zu entnehmen ist, nimmt bei den Kulturen 1 und 2, deren pH-Wert unter 5,0 liegt, die Xanthomegnin-Bande ab dem 2. – 3. Tag zu, um dann am 5. – 6. Tag wieder schwächer und langsam von blauen Banden ober- und unterhalb der gelben Bande abgelöst zu werden. Im Chromatogramm von Kultur 3 lässt sich ab dem 7. Tag ein deutlicher Rückgang der Xanthomegninbande erkennen, die am 9. Tag nahezu gänzlich verschwunden ist. Bei Kultur 4 lässt sich im Bandenmuster schon am 6. Tag kaum noch eine gelbe Bande erkennen und in Kultur 5 lässt sie sich am 2. und 3. Tag gerade noch erahnen, bis im Chromatogramm von Kultur 6 keine Xanthomegninbande mehr sichtbar wird.

Es sei noch anzumerken, dass hier auch nachgewiesen wurde, dass sich das Xanthomegnin nicht von vornherein im gewaschenen Pilz oder im Nährmedium befunden hat, dies zeigt die erste Bande auf der Dünnschichtplatte, bei der eine Probe aufgetragen wurde, die direkt nach Ansetzen der Kultur (Tag 1) entnommen und extrahiert wurde.

4.4 Wachstum des Pilzes

Um das Wachstum des Pilzes in den verschiedenen pH-Nährmedien festzustellen, wurden die zu extrahierende Flüssigkeit durch einen zuvor gewogenen Filter gegossen und das über Nacht getrocknete Pilzmycel gewogen. Dieser Versuch wurde zwei Mal durchgeführt. In keiner der Kulturen zeigte sich ein messbares Pilzwachstum.

Tabelle 10: Wachstum von *Trichophyton rubrum* in den pH-Medien (Gewicht angegeben in Gramm)

Kultur Tag	1	2	3	4	5	6
1	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04
2	0,04	0,05	0,05	0,04	0,03	0,04
3	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
4	0,04	0,05	0,04	0,03	0,04	0,03
5	0,04	0,05	0,04	0,04	0,05	0,04
6	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04
7	0,04	0,05	0,03	0,04	0,04	0,04
8	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04
9	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05
10	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04

Wachstumsverhalten des Pilzes in den pH-Nährmedien

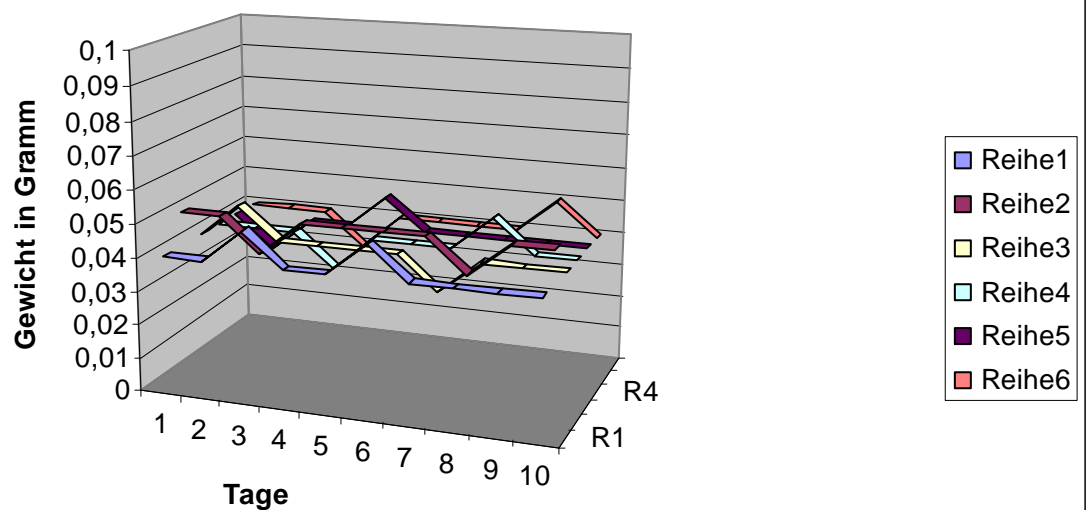


Abbildung 28: Wachstumsverhalten von *Trichophyton rubrum* in den pH-Medien

4.5 Verhalten des pH-Wertes des Nährmediums während der Inkubation

Während der Inkubation wurde von jeder Kultur täglich der pH-Wert gemessen, um eventuelle Veränderungen erfassen zu können. Hierbei zeigte sich, dass nur bei den Kulturen 1-3 ein geringer Anstieg und dann wieder Abfall des pH-Wertes erfolgte. Die Kulturen 4-6 änderten ihren pH-Wert nicht.

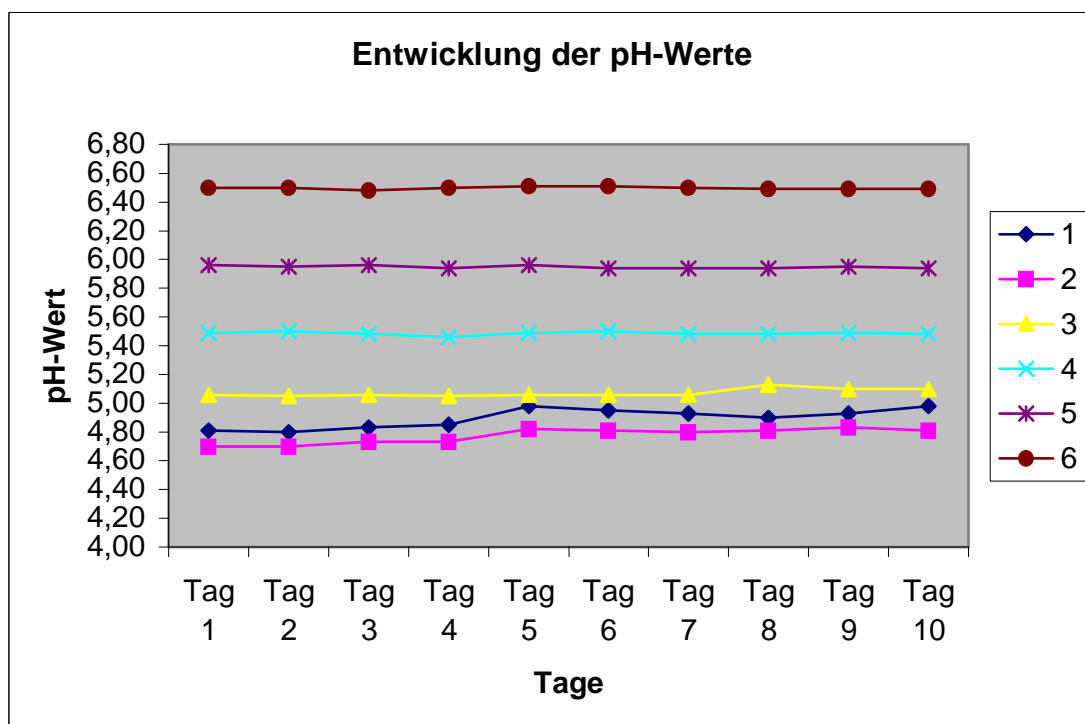


Abbildung 29: Entwicklung der pH-Werte während der Inkubation

4.6 Densitometrische Versuche

Durch das Auftragen von vier Standardproben zusammen mit den Rohextrakten einer Zeitreihe mit *Trichophyton rubrum* (Anfangs-pH 4,7 = ungepuffert) wurde es möglich, die Xanthomegnin-Banden densitometrisch zu scannen und eine Quantifizierung der Xanthomegnin-Produktion zu erlangen. Die gescannte Platte ist in Abbildung 29 dargestellt, die ersten vier Säulen zeigen die Xanthomegnin-Standard-Banden, die darauffolgenden Zehn Tag 1 bis 10 der Zeitreihe, wobei Tag 1 hier 24 Stunden nach Ansetzen der Pigment-Kultur meint.

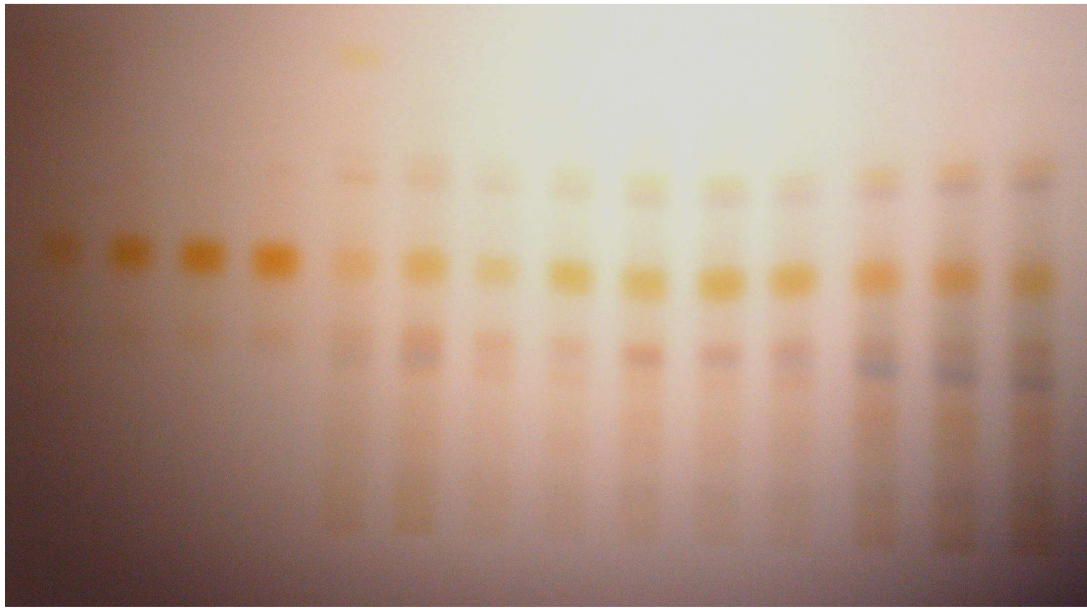


Abbildung 30: Zeitreihe T.rubrum mit vier Xanthomegnin-Standards zur densitometrischen Messung

Die Software des Scanners berechnete nun selbständig die Menge der sich in der Bande befindlichen Substanz. Unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors (Probe c-j wurden zur Erlangung einer besseren Verhältnismäßigkeit 1:3 verdünnt) ließ sich so die Gesamtmenge von Xanthomegnin im Rohextrakt bestimmen:

- Die Proben a und b enthielten 200 μ l Rohextrakt, von denen 15 μ l auf der Dünnschichtplatte entwickelt und gescannt wurden, die gescannte Menge wurde also jeweils mit dem Faktor $200/15$ multipliziert.
- Die Proben c bis j enthielten nach weiterer Verdünnung mit Methanol 600 μ l, auch hier wurden je 15 μ l aufgetragen, entwickelt und gescannt. Die gescannte Menge wurde dann jeweils mit dem Faktor $600/15$ multipliziert.

Tabelle 11: gescannte und von *T.rubrum* produzierte Xanthomegninmengen

Berechnete Xanthomegninmengen der einzelnen Proben		
	gescannt in µg	Gesamtmenge im Rohextrakt
Probe a - 1. Tag	11,43	152,4
Probe b - 2. Tag	17,4	232
Probe c - 3. Tag	14,95	598
Probe d - 4. Tag	22,25	890
Probe e - 5. Tag	19,82	792,8
Probe f - 6. Tag	23,72	950
Probe g - 7. Tag	25,49	1019,6
Probe h - 8. Tag	17,93	717,2
Probe i - 9. Tag	17,06	682,4
Probe j - 10. Tag	14,95	598
Summe		6632,4

Insgesamt konnten also aus dieser Zeitreihe aus einer 500 ml Kultur, die 0,5 g Trockengewicht des Pilzmyzels enthielt, 6632,4 µg, das heißt 6,63 mg extrahiert werden.

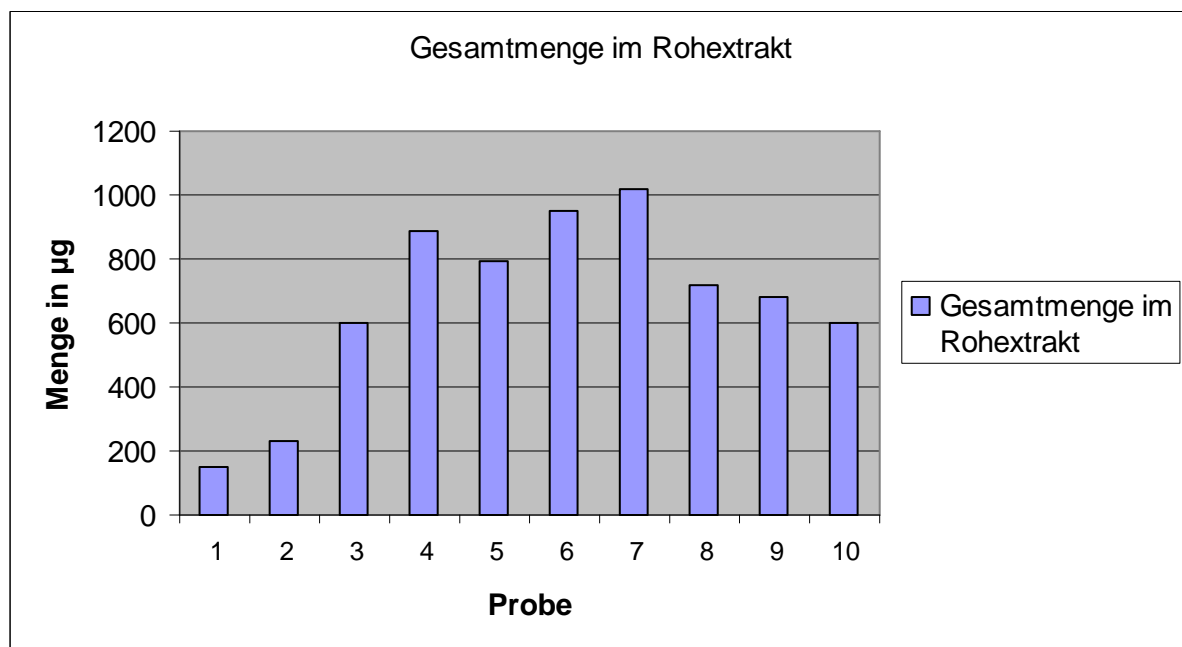


Abbildung 31: Produktionsmenge von Xanthomegnin einer Kultur von *T.rubrum* über 10 Tage

4.7 Strukturaufklärung

In Zusammenarbeit mit dem Institut für organische Chemie und Biochemie II der TU München konnte die Struktur des aufgereinigten Pigments geklärt werden. Die ^1H -NMR ergab die für Xanthomegnin bekannte Summen- und Strukturformel, so dass die extrahierte Substanz als Xanthomegnin identifiziert werden konnte.

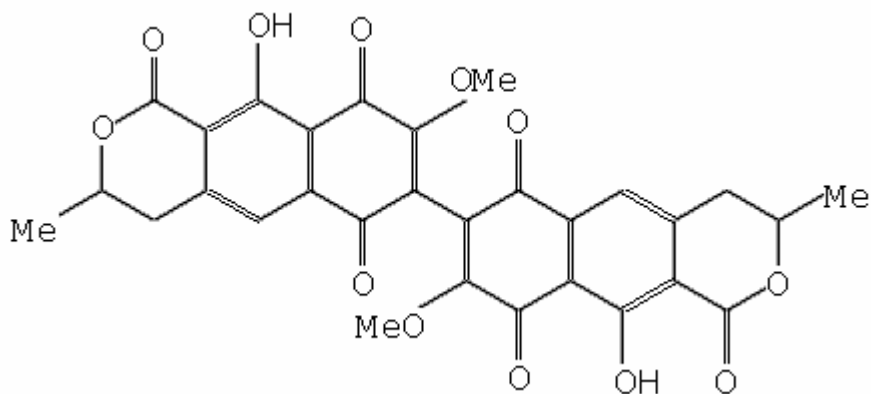
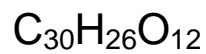


Abbildung 32: Summen- und Strukturformel von Xanthomegnin

4.8 Essay zur Produktion von Xanthomegnin unter den erarbeiteten

Bedingungen

Aus den durchgeführten Untersuchungen ergibt sich nun folgender EssayAlgorithmus zur Isolierung von Xanthomegnin aus *Trichophyton rubrum*:

Anzucht des Pilzmaterials aus einem Stamm von *T.rubrum* in flüssigem Nährmedium für **3 Tage**



Herstellen des flüssigen Nährmediums zur Pigmentproduktion (1b-Medium):

→ auf 100 ml aqua dest.: 1 g Glucose, 0,15 g Magnesiumsulfat,
0,3 g Kaliumhydrogenphosphat, **0,3 g Tryptophan** → **pH 4,7**



Einwiegen von **0,5 g** gewaschenem Pilzmaterial in 100 ml flüssiges Nährmedium zur Pigmentproduktion



Inkubation des Ansatzes für **7 Tage bei 24 °C**



Extraktion des Pigments mit Ethylacetat



Aufreinigung mittels präparativer Dünnschichtschromatographie und HPLC

5 Diskussion

Mykotoxine als Metabolite von Dermatophyten fanden bisher in der Literatur weit weniger Beachtung als Toxine, die Pathogenitätsfaktoren von Schimmelpilzen darstellen. Dennoch ist erwiesen, dass auch Dermatophyten die Fähigkeit zur Produktion von Mykotoxinen besitzen, von denen Xanthomegnin als Naphthoquinon eine größere Rolle spielt. Über die Produktionsbedingungen dieses sekundären Metaboliten verschiedener Pilzarten und auch über seine Funktion und Toxizität ist bis heute nur wenig bekannt (Gupta, Ahmad, Borst, & Summerbell, 2000). Als sehr wahrscheinlich gilt, dass Xanthomegnin die Kulturfarbe von *Trichophyton rubrum* erklärt (Wirth, Beesley, & Anand, 1964), außerdem scheint es eine toxikologische Bedeutung bei mit *Penicillium* oder *Aspergillus* spp. kontaminiertem Tierfutter zu haben (Muller & Boley, 1993; Stack, Brown et al., 1978) und mit der zellulären Atmungskette zu interferieren (Kawai & Cowger, 1981). 2000 konnten Gupta et. al. Xanthomegnin auch in mit *Trichophyton rubrum* infiziertem Haut- und Nagelmaterial finden und somit zeigen, dass es sogar in vivo produziert wird (Gupta, Ahmad, Borst, & Summerbell, 2000). In dieser Arbeit ist eine Methode dargestellt, mit der das bisher nur schwer extrahierbare instabile Xanthomegnin (Medentsev & Akimenko, 1998) in größeren Mengen aus *Trichophyton rubrum* extrahiert werden kann.

Die Eigenschaft von Dermatophyten, Pigmente zu produzieren, ist schon seit mehr als einhundert Jahren bekannt. Vor allem in den fünfziger und sechziger Jahren stellte dieses Thema für die Forschungswelt einen interessanten Ansatzpunkt dar, seitdem ist es jedoch weitgehend in Vergessenheit geraten.

Die charakteristische rot bis braune Kulturfarbe einiger Dermatophyten wurde schon sehr früh von Tate untersucht (Tate, 1929). Bemerkenswert war, dass nach Extraktion die Farbe im sauren Milieu nach gelb umschlug, im alkalischen wie gewohnt rot-braun erschien.

Diese Eigenschaft konnte auch in der vorliegenden Arbeit anhand der chromatografischen Versuche festgestellt werden. Nach Entwicklung im sauren Laufmittel erschien die Xanthomegnin-Bande gelb, wurde sie mit Ammoniak bedampft, nahm sie eine rot-braune Farbe an. Dies gibt den entscheidenden Hinweis

darauf, dass Xanthomegnin für die Kulturfarbe der es produzierenden Dermatophyten maßgeblich verantwortlich ist, denn auch bei der physiologischen Alkalisierung des Wachstumsmediums mittels der chromatografischen Versuche wurde die bekannte Tatsache deutlich, dass es sich bei dem von den Dermatophyten gebildeten Pigment nicht um einen einzelnen Stoff handelt, sondern um eine Zusammensetzung aus vielen einzelnen Komponenten. Pinetti war 1949 der erste, der versuchte, aus *Trichophyton violaceum* extrahierte Pigmente mittels Säulenchromatographie zu trennen (Pinetti, 1949), es folgten Mier (Mier, 1957) und McCabe (McCabe & Mier, 1960), die erstmals Papierchromatographie anwandten. Wirth et. al. konnten aus *Trichophyton rubrum* verschiedene kristalline Pigmente extrahieren, die unterschiedliche Farben und Eigenschaften zeigten. Somit war eindeutig widerlegt, dass es sich bei dem Pigment um nur eine einzige Substanz handelte (Wirth, O'brien, Schmitt, & Sohler, 1957). Die chemische Klassifikation der Pigmente wurde zunächst vielfach diskutiert, hauptsächlich war man der Meinung, es handele sich um Anthraquinonderivate (Koehne, Wolf Et Al., 1962; Silva, 1953; Tate, 1929), aber auch eine melanoide Herkunft des Pigments wurde in Betracht gezogen (Zussman, Lyon, & Vicher, 1960). Als 1963 das Naphthoquinon Xanthomegnin als erstes Pigment eines Dermatophyten extrahiert und identifiziert wurde (Blank, Day, & Just, 1963) und wenig später die Strukturformel bekannt war (Just, Day Et Al., 1963), wurden mittels Extraktion und chromatographischen Methoden in den folgenden Jahren einige Pigmente aus verschiedenen keratinophilen Pilzen identifiziert (Blank, NG et al., 1966; Nozawa, 1967; Pohloudek-Fabini, Wollmann et al., 1967; Wirth, Beesley, & Anand, 1964). Die verwendeten Methoden bei all diesen Untersuchungen zur Pigmentproduktion durch Dermatophyten waren jedoch sowohl sehr arbeits- als auch zeitaufwändig und die zur Extraktion verwendeten Chemikalien brachten oft Probleme mit sich, da sie teilweise die Beschaffenheit der Pigmente veränderten. Zudem war es sehr schwierig, getrocknetes Pilzmyzel in seine Bestandteile aufzutrennen und das Pigment zu extrahieren (Walker & Milovanovic, 1970). Schon die Dauer der Inkubation reichte von drei bis vier Wochen (Zussman, Lyon, & Vicher, 1960) bis hin zu sechs bis acht Wochen (Wirth, O'brien, Schmitt, & Sohler, 1957). Durch die hier verwendete Methode konnte die Pigmentproduktion im flüssigen Nährmedium derart beschleunigt werden, dass schon nach drei bis vier Tagen eine beträchtliche Menge an Xanthomegnin extrahiert werden konnte, nach sieben Tagen war die maximale Produktionsmenge für den Metaboliten zu verzeichnen.

Die früheste erkennbare Färbung einer Kultur wurde von Zussmann nach sechs Tagen angegeben (Zussman, Vicher, & Lyon, 1961). In der vorliegenden Untersuchung trat schon nach 24 Stunden eine, wenn auch noch blasse Färbung des Nährmediums durch gewaschenes Pilzmyzel auf. Auch die einzelnen Arbeitsschritte zur Extraktion an sich nahmen bei den früheren Untersuchern viel Zeit und Aufwand in Anspruch. Wirth et. al. gaben als Zeitraum für die gesamte Extraktion wenige Tage an, allerdings führten sie eine aufwändige Säulenchromatographie durch, die mehrere Male wiederholt werden musste, um schließlich „red needles“, „purple needles“ und „orange plates“ zu erhalten (Wirth, O'brien, Schmitt, & Sohler, 1957). Zussmann et al verwendeten ein ähnliches Verfahren wie Wirth et. al. (Zussman, Lyon, & Vicher, 1960) mit vergleichbarem Aufwand. Walker et. al. benötigten allein für die Extraktion des Pigments aus verschiedenen Dermatophyten bis zu mehreren Wochen (Walker & Milovanovic, 1970). Mit der hier beschriebenen Methode ist es möglich, innerhalb eines Tages die Extraktion des Materials für die HPLC durchzuführen. Als Chemikalien zur Farbextraktion wurden in der Vergangenheit hauptsächlich Essigsäure, Chloroform, Natrium(hydrogen)carbonat und Aceton verwendet. Walker vermutete bei der Anwendung von organischen Extraktionsmitteln eine Farbreduktion oder –verfälschung in den Extrakten und verwendete deshalb nur anorganisches Material (Walker & Milovanovic, 1970). Alle bisher beschriebenen Arbeitsgruppen benutzten für die Extraktion der Pigmente das Pilzmyzel an sich, indem sie es vom Nährmedium trennten und dann entweder luftgetrocknet und pulverisiert (Baichwal & Walker, 1960; Koehne, Wolf, & Jones, 1962; Mier, 1957; Wirth, O'brien, Schmitt, & Sohler, 1957; Zussman, Lyon, & Vicher, 1960) oder gefriergetrocknet (Ito, Nozawa et al., 1968; Walker & Milovanovic, 1970) weiter verarbeiteten. In der hier beschriebenen Methode wird das Pigment nicht nur aus dem Pilzmyzel an sich, sondern auch aus dem Nährmedium extrahiert, an das die Stoffe vom Pilz abgegeben wurden. Hierdurch ergab sich die Möglichkeit, größere Mengen aus *Trichophyton rubrum* zu extrahieren, als es bisher der Fall war. Blank et. al. extrahierten aus zwei Kilogramm Pilzmycel von *Trichophyton megninii* 1200 mg Xanthomegnin (Blank, Day, & Just, 1963). Hier konnten aus nur 0,5 g (Trockengewicht) Pilzmaterial 6,63 mg Xanthomegnin extrahiert werden.

Die meisten Arbeitsgruppen trennten die Pigmente mittels Säulenchromatographie auf, nur wenige verwendeten die Dünnschichtchromatographie, unter anderem Ito et al. (Ito, Nozawa, & Yoneya, 1968), die diese Methode jedoch nicht, wie hier beschrieben, zur Gewinnung von Pigment, sondern lediglich zur Auftrennung und Darstellung der einzelnen Farbkomponenten anwandten. Erst mit Entwicklung der HPLC in den siebziger Jahren war es möglich, Substanzen sehr genau zu analysieren und zu präparieren, jedoch hatte man zu diesem Zeitpunkt den Forschungssektor zur Pigmentproduktion durch Dermatophyten schon weitgehend verlassen. Es wurden dann fast nur noch Schimmelpilzarten untersucht, man fand Xanthomegnin in *Penicillium viridicatum* (Peterson & Grove, 1983), *Penicillium cyclopium* (Stack & Mislivec, 1978), *Aspergillus sulphureus* und *Aspergillus melleus* (Durley, MacMillan et al., 1975) sowie *Aspergillus ochraceus* und *Apergillus ostianus* (Robbers, Hong et al., 1978).

Die folgende Tabelle vergleicht die hier entwickelte Methode mit denen früherer Arbeiten:

Tabelle 12: Vergleich der Methoden zur Extraktion von Xanthomegnin

	Wirth et.al., 1957	Blank et.al., 1963	Walker et. al., 1970	Peterson et.al., 1983	Gupta et.al., 2001	Vorliegende Arbeit
Verwendeter Pilz	<i>T.rubum</i>	<i>T.megninii</i>	<i>T.tonsurans</i>	<i>P.viridicatum</i>	<i>T.rubrum</i> (von Kultur und aus infiziertem Nagelmaterial)	<i>T.rubrum</i>
Verwendetes Nährmedium	Sabouraud Dextrose-Agar	Sabouraud Dextrose-Agar + 0,005 % Inositol + 0,001 % Thiamin	Flüssig: 2% Glukose, 1%Pepton	Flüssig: Reismedium (500 g Reis zu 500 ml aqua dest.)	Saouraud Dextrose-Agar	1b-Medium: 1 g Glukose 0,05 g MgSO ₄ 0,3 g KH ₂ PO ₄ 0,3 g Tryptophan
Dauer der Inkubation	6-8 Wochen	6-8 Wochen	21 Tage	29 Tage	4 Wochen	7 Tage
Methode von Extraktion und Auftrennung der Pigmente	Gesamtes Myzel abgetötet, gewaschen, getrocknet und zermahlen Säulenchromatographie Eluat:Ethylen-Dichlorid:Eisessig 2x rechromatographiert	Gesamtes Myzel (2kg) abgetötet, gewaschen, getrocknet und zermahlen Säulenchromatographie Eluate: Essigsäure Chloroform Benzin 3 x rechromatographiert	Myzel gewaschen, gefriergetrocknet, Extraktion über Soxhlet (Benzin, Methan, Chloroform-Methanol) Dünnschichtchromatographie (Buthanol:Ethanol:Wasser 40:11:19) Nur analytische Untersuchungen, keine Gewinnung von reinem Xanthomegnin	6 Liter Medium extrahiert mit 10 Litern Dichlormethan, Mehrmals gewaschen und extrahiert mit Hexan und dann Methanol präparative HPLC	Pilz mit Medium gemörsert, extrahiert mit Methanol:Chloroform: Essigsäure 50:50:1 Mehrmals filtriert und evaporiert Analytische HPLC	Extraktion mit Ethylacetat, Evaporiert Präparative Dünnschichtchromatographie (Toluol:Ethylformiat:Acetonsäure 10:5:3) HPLC
Dauer v. Extraktion und Aufbereitung u/o Anzahl der Arbeitsschritte	Ca. 2 Wochen	18 Arbeitsschritte (keine genaue Zeitangaben)	Ca. 4 Wochen	Ca. 3 Tage (Keine genaue Zeitangabe)	Ca. 1 Tag	Ca. 1 Tag
Menge des extrahierten Stoffes	3,5 g „orange plates“ (später aus Xanthomegnin extrahiert) aus 500g Pilzmyzel (Menge nach Inkubation)	1200 mg aus 2kg Myzel (Menge nach Inkubation)	20 mg „braunes Puder“ pro geerntetem Myzel (keine Mengenangabe) kein reines Xanthomegnin, nur Pigmentgemisch	1,33 g Xanthomegnin aus 3 kg Reis	Keine Mengenangaben	6,63 mg aus 2,5 g Myzel (in NaCl)

Über Farbbestimmung, Absorptionsspektren und auch Rf-Werte konnten von den Autoren einzelne Pigmente anhand ihrer Eigenschaften unterschieden und benannt werden. Meist erfolgte dann wenig später die Strukturaufklärung der Stoffe, die in der Regel zu den Naphthoquinonen gezählt werden konnten (Summerbell, 2000). So nannten Blank et. al. das aus *Trichophyton megninii* extrahierte gelbe Pigment Xanthomegnin (Blank, Day, & Just, 1963), die Aufklärung seiner Struktur wurde von Just et. al. vorgenommen (Just, Day, & Blank, 1963). Sie extrahierten außerdem noch ein rotes Pigment, das den Namen Purpuromegnin bekam und ein weiteres gelbes Pigment mit dem Namen Megninal (Blank, Day, & Just, 1963). Zwei Jahre später identifizierten dann Wirth et.al. die von ihnen aus *Trichophyton rubrum* extrahierten „orange plates“ ebenfalls als Xanthomegnin. Bei weiteren Untersuchungen an *T. violaceum* wurden noch zwei weitere Pigmente, nämlich Vioxanthin und Viopurpurin und später noch Viomellein extrahiert (NG, G.Just et al., 1969), Xanthomegnin stellte sich allerdings hierbei als die Hauptkomponente der Farbzusammensetzung heraus (Blank, Ng, & Just, 1966). Andere extrahierte Stoffe waren Trichorubin und Trichopurpurin, die sowohl aus *Trichophyton mentagrophytes* als auch *Trichophyton rubrum* extrahiert wurden (Pohloudek-Fabini, Wollmann, & Ganjoo, 1967). Anhand dünnschichtchromatographischer Ergebnisse identifizierten Ito et. al. 1968 vier weitere Pigmente aus verschiedenen Dermatophyten: Aurosporin, Citrosporin, Violosporin und Rubrosporin (Ito, Nozawa, & Yoneya, 1968).

Tabelle 13 zeigt die bisher aus Dermatophyten identifizierten und benannten Pigmente:

Tabelle 13: Bisher extrahierte und benannte Pigmente aus Dermatophyten

Autor/Jahr	Farbe des Pigments	Name des Pigments	Dermatophyt
Blank, Day & Just, 1963	Gelb	Xanthomegnin	<i>T.megninii</i>
Blank, Day & Just, 1963	Rot	Purpuromegnin	<i>T.megninii</i>
Blank, Day & Just, 1963	Gelb	Megninal	<i>T.megnii</i>
Pohloudek-Fabiani et.al., 1967	Rot	Trichorubrin	<i>T.mentagrophytes</i> <i>T.rubrum</i>
Pohloudek-Fabiani et.al., 1967	Rot	Trichopurpurin	<i>T.mentagrophytes</i> <i>T.rubrum</i>
Ito et.al., 1968	Gelb	Aurosporin	<i>T. violaceum</i> <i>M.cookei</i>
Ito et.al., 1968	Orange	Citrosporin	<i>T. violaceum</i> <i>M.cookei</i>
Ito et.al., 1968	Violett	Violosporin	<i>T. violaceum</i> <i>M.cookei</i>
Ito et.al., 1968	Rot	Rubrosporin	<i>T. violaceum</i> <i>M.cookei</i>
NG, Just et.al., 1969	Gelb	Vioxanthin	<i>T.violaceum</i>
NG, Just et.al., 1969	Rot	Viopurpurin	<i>T.violaceum</i>
NG, Just et.al., 1969	Rot	Viomellein	<i>T.violaceum</i>

Es ist schwer nachzuvollziehen, ob und wo sich diese Stoffe auch in den Dünnschichtchromatogrammen dieser Arbeit wieder finden, da angegebene Rf-Werte von verschiedenen Faktoren wie zum Beispiel der Art des Laufmittels oder der Temperatur abhängig (Brenner, Niederwieser et al., 1962; Burma, 1951) und somit nicht hinreichend reproduzierbar sind.

Von diesen Stoffen sind außerdem keine Standardproben erhältlich, welche man als Vergleich auf den Platten hätte mitlaufen lassen können.

Zudem wurden hier keine Absorptionsspektren der einzelnen Banden gemessen. Lediglich Xanthomegnin ist durch Vergleiche mit Standards und Strukturaufklärung als Hauptkomponente der Pigmentkomposition einiger Dermatophyten identifizierbar. Hierbei ist darauf hinzuweisen, dass der von uns verwendete Stamm von *Trichophyton violaceum* keine deutliche Xanthomegninbande zeigt, wie in der Literatur beschrieben (NG, G.Just, & F.Blank, 1969). Deutliche Xanthomegninbanden erschienen bei den Chromatogrammen der Dermatophyten *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton rubrum granulare*, *M. cookei*, *Trichophyton megninii* und *Trichophyton soudanense*. Der in dieser Arbeit untersuchte Wildstamm von *Epidermophyton floccosum* zeigte keine oder eine nur sehr geringe Pigmentproduktion, vorangehende Studien konnten aber wiederholt Pigmentbildung durch diese Dermatophyten-Art nachweisen (F.Blank, C.Buxtorf et al., 1969; Ito, Nozawa, & Yoneya, 1968; Walker & Milovanovic, 1970). Die Unterschiede in den Ergebnissen der zahlreichen Untersuchungen zur Pigmentproduktion von Dermatophyten lassen darauf schließen, dass eine große Abhängigkeit der Produktion dieser sekundären Metabolite von vielen verschiedenen Faktoren besteht. Unterschiedliche Dermatophytenarten scheinen jeweils andere Pigmente zu produzieren, wobei sich einige Arten in Bezug auf die Pigmentproduktion sehr zu ähneln scheinen, andere wiederum ein vollkommen verschiedenes Chromatogramm vorweisen. Es gibt Ansätze zur Vermutung, dass die produzierten Farbkomponenten der einzelnen Dermatophyten eher in ihrem Verhältnis zueinander als in ihrer Art an sich differieren (Summerbell, 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen aufgrund der teilweise sehr unterschiedlichen Chromatogramme eher gegen diese These, hier könnten jedoch noch weitere Untersuchungen angeschlossen werden. Auch die Unterschiede der Pigmentproduktion in den einzelnen Stämmen einer Art – der hier untersuchte Referenzstamm des CBS von *T. rubrum* produzierte beispielsweise im Gegensatz zum Wildstamm kaum Pigment - sind bemerkenswert und könnten auf eine große Variabilität im Polyketidsyntheseweg der Dermatophyten hinweisen. Walker et. al. wiesen zudem darauf hin, dass die Gewinnung von Pigment sehr abhängig ist von der angewendeten Methode, den verwendeten Extraktionsmitteln, der Beschaffenheit des Pilzmycels und anderem (Walker & Milovanovic, 1970).

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode vorgestellt, in der eine Pigmentextraktion mit möglichst wenig Aufwand gelingt und die Potential für weitere Untersuchungen zu Pigmentproduktion von Dermatophyten bietet.

Wenig untersucht wurde bisher die Bildung von Fluorochromen durch Dermatophyten. Kalicinski et. al. fanden 1975 in den Dünnschichtchromatogrammen einige Dermatophyten im Wood-Licht eine fluorochrome Bande, die sie für ein Aflatoxin-ähnliches Produkt hielten, da es sich in Bezug auf Rf-Wert und Farbeigenschaften wie ein Aflatoxin B-Standard verhielt (Kalicinski, Prochacki et al., 1975). In der vorliegenden Arbeit wurden alle Dünnschichtchromatogramme unter UV-Licht fotografiert und die Rf-Werte der einzelnen Banden ermittelt, es erfolgte jedoch keine weitere Klärung der Identität einzelner Stoffe. Die gelbe Xanthomegninbande zeigte sich weder unter UV 366 noch unter UV 254, so dass es sich nicht um einen fluoreszierenden Stoff handelt. In diesem Zusammenhang könnte mit der vorliegenden Methodik noch das Phänomen der unter Wood-Licht fluoreszierenden, mit *Microsporum canis* befallenen Hautareale bei der Mikrosporie (Prevost, 1983; Trovato, Schwartz et al., 2006) untersucht werden. In den hier erstellten Dünnschichtchromatogrammen konnten allerdings keine auffälligen fluoreszierenden Banden dargestellt werden. Eine Weiterverfolgung dieser Thematik böte jedoch sicher einen interessanten Ansatzpunkt.

Die Kulturfarbe von *Trichophyton rubrum* und auch anderen Dermatophyten zeigt sich schon auf einem herkömmlichen Selektivagar. Doch es erwies sich als schwierig, mittels beschriebener Methodik aus diesen Kulturen genug Pigment zu erzeugen, um es auf der HPLC weiter zu präparieren und zu analysieren. Daher wurde ein Nährmedium entwickelt, das seine Grundlage aus den Medien zur tryptophanabhängigen Pigmentproduktion von *Malassezia*-Hefen hat (Mayser, Wille et al., 1998) und für Dermatophyten modifiziert wurde. Dieses Medium stellt mit Glukose und Elektrolyten sowie Tryptophan als alleinige Stickstoffquelle für Dermatophyten nur ein minimales Angebot an Nährstoffen bereit. Es ist bekannt, dass durch ein hauptsächliches Angebot von Glukose und Fehlen von Proteinen sowohl die Enzymproduktion als auch das Wachstum der Pilze gehemmt wurde (Brasch, Martins et al., 1991; Takahashi, 1962).

In den vorliegenden Ergebnissen zeigte sich kein oder nur ein geringes Wachstum des Pilzes im Medium zur Pigmentproduktion. Hieraus ist zu schließen, dass *Trichophyton rubrum* Xanthomegnin unter Stressbedingungen produziert hat,

in denen durch minimales Nahrungsangebot der Pilz zwar am Leben gehalten wurde, jedoch keine Zellproliferation stattfinden konnte. Tatsächlich stellte Medentsev bei Untersuchungen an verschiedenen *Fusarium*-Arten fest, dass deren Naphthoquinonproduktion durch Stress der Zellen und somit Wachstumsinhibition oder –stillstand des Pilzes angeregt wurde (Medentsev, Arinbasarova et al., 2005). Allerdings scheint eine Pigmentproduktion nicht nur von Wachstums hemmung und Stress auszugehen. Nach den vorliegenden Ergebnissen bilden nur frisch angezüchtete Pilze eine große Menge an Pigment. Die Stoffwechselaktivität scheint in der Kultur nur in den ersten Lebenstagen ausreichend, um viel Pigment zu produzieren, danach scheint keine effektive Enzymaktivität für eine Pigmentproduktion mehr vorhanden zu sein.

Auch eine Abhängigkeit der Pigment- und Xanthomegninproduktion vom pH-Wert der Kultur konnte hier festgestellt werden. Als optimaler pH-Wert für das Wachstum von Dermatophyten wird ein Wert zwischen 6 und 6,5 angesehen (Danew & Klossek, 1989; Refai & Rieth, 1964). In den vorliegenden Untersuchungen hat sich gezeigt, dass bei einem pH-Wert von 4,7, also eher im sauren Milieu, mit dem verwendeten Medium die besten Ergebnisse in Hinblick auf die Xanthomegninproduktion erzielt werden konnten. Somit sind hier Stressbedingungen für den Pilz nicht nur durch das minimale Nahrungsangebot, sondern auch durch den sauren pH-Wert geschaffen worden. Interessant ist hierbei demnach folgende Feststellung: Je höher der pH-Wert der Kultur angesetzt war, desto schwächer wurden die Xanthomegninbanden. Schon bei einem pH des Nährmediums von 6,0 zeigen sich nur noch ansatzweise die gelben Banden, bei pH 6,5 sind sie gänzlich verschwunden. Hinzu kommt die Tatsache, dass bei steigendem pH-Wert die Bande immer schneller verschwindet, bei einem pH von 5,5 ist sie ab dem 8. Tag nicht mehr zu sehen, bei pH 6,0 erkennt man nur bis zum vierten Tag eine nennenswerte Xanthomegnin-Bande.

Die Produktion scheint also nicht nur durch höheren pH-Wert gehemmt zu werden, es sieht so aus, als würde der Stoff auch schneller wieder zersetzt. Unterstützt wird dieser Vorgang durch die Eigenschaft der Dermatophyten, bei der Verstoffwechslung von Nährstoffen Ammoniumionen herzustellen und so das Nährmedium zu alkalisieren (Kunert, 1970; Okafor & Ada, 2000; Refai & Rieth, 1964; Ziegler & Bohme, 1969).

Ein auch hier festgestellter leichter Anstieg des pH-Wertes der Nährmedien könnte zu einer Hemmung der Xanthomegninproduktion geführt haben. Danew fand zudem 1989 heraus, dass bei niedrigerem pH-Wert in Nährmedien von *Trichophyton mentagrophytes* ein verzögerter Abbau von Aminosäuren stattfand als in Medien mit höherem pH-Wert (Danew & Klossek, 1989). Dies wäre ein weiterer Ansatz für die Klärung einer Ursache der pH-Abhängigkeit der Xanthomegninproduktion.

Auch die Wahl der Aminosäure im Nährmedium hatte großen Einfluss auf die Pigmentproduktion des Pilzes. Es zeigte sich, dass mit Tryptophan als Stickstoffquelle von allen untersuchten Substanzen die schnellste und auch größte Produktion von Pigment zu beobachten war. Zussman et. al. untersuchten 1961 ebenfalls die Pigmentbildung von *Trichophyton rubrum* im Zusammenhang mit verschiedenen Aminosäuren (Zussman, Vicher, & Lyon, 1961), allerdings wurden dem flüssigen Nährmedium wesentlich geringere Mengen der Aminosäuren zugeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass Tyrosin als Stickstoffquelle zur Pigmentproduktion am besten geeignet war. Tyrosin konnte jedoch in der vorliegenden Untersuchung aufgrund der zu geringen Löslichkeit im verwandten Nährmedium nicht eingesetzt werden. Zussman et. al. fanden zudem eine gute Pigmentproduktion bei Phenylalanin und Tryptophan, bei allen anderen Aminosäuren zeigte sich nur sehr wenig oder keine Pigmentbildung. Auch in dieser Arbeit ist eine Pigmentproduktion mit Phenylalanin als Stickstoffquelle zu verzeichnen, jedoch deutlich langsamer und weniger als mit Tryptophan. Eine Xanthomegnin-Bande ist im Chromatogramm mit Phenylalanin nur schwach zu erkennen.

Es fällt auf, dass es sich bei den drei Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan um die drei aromatischen Aminosäuren handelt. Schon 1965 vermuteten Gatenbeck et. al. (Gatenbeck & Bentley, 1965), dass es sich bei dem primären Metaboliten der Biosynthese von Pigmenten der *Fusarium*-Art um eine aromatische Säure handeln muss, die, wie sich später herausstellte, zu Fusarubinsäure methyliert wird (Parisot, Devis et al., 1988). Hierüber entstehen nun verschiedene Naphthoquinone der *Fusarium*-Art, wie zum Beispiel Fusarubin oder Javanicin (Parisot, Devys et al., 1990).

Der genaue Syntheseweg von Xanthomegnin ist bisher nicht näher untersucht worden. Jedoch führten Zussman et. al. im Rahmen ihrer Untersuchungen auch einen Versuch mit C14-markiertem Tyrosin durch. Dieses fand sich im extrahierten Pigment wieder, so dass vermutet wurde, dass das Kohlenhydrat-Skelett in das

Pigmentpolymer eingebaut wurde (Zussman, Lyon, & Vicher, 1960). Zussman et. al. überlegten weiterhin, ob Phenylalanin oder Tryptophan mit ihrer ähnlichen Strukturformel während der Pigmentsynthese in Tyrosin umgewandelt werden könnte. Tryptophan wird von Dermatophyten schlecht verstoffwechselt, jedoch wird hier scheinbar der Indolring der Aminosäure komplett gespalten und das Pigment entsteht über den Polyketidsyntheseweg durch Neusynthese aus AcetylCoA, anders als bei der tryptophanabhängigen Pigmentsynthese von *Malassezia*-Hefen. Hier wird der Indolring des Tryptophans direkt in das Pigment eingebaut (Mayser, Stapelkamp et al., 2003). Weitere Untersuchungen mit isotoopenmarkierten (¹³C) Aminosäuren könnten klären, ob bei den Dermatophyten die aromatischen Aminosäuren Startermoleküle für die Synthese von Xanthomegnin als einzelnen Sekundärmetabolit liefern und ob die Produktion des Naphthoquinons abhängig ist vom Vorliegen einer dieser Aminosäuren.

Das Mykotoxin Xanthomegnin ist nicht nur sekundärer Stoffwechselmetabolit von Dermatophyten, sondern auch von einigen *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten (Carlton, Stack, & Eppley, 1976; Ciegler, Lee et al., 1981; Medentsev & Akimenko, 1998; Stack & Mislivec, 1978). Als Mykotoxin wurde Xanthomegnin zunächst im Zusammenhang mit der mitochondrialen Atmungskette untersucht. Ito et. al. beschrieben zuerst die Eigenschaft von Xanthomegnin, die Atmungskette in den Mitochondrien von Rattenlebern zu entkoppeln (Ito, Nozawa, & Kawai, 1970). Es folgten weitere Studien zum Mechanismus dieses Vorgangs (Kawai, Akita et al., 1976; Kawai, Akita et al., 1978; Kawai & Cowger, 1981; Kawai & Nozawa, 1979). Weiterhin wurde dem Pigment genotoxisches (Mori, Kawai et al., 1984) sowie nephro- und hepatotoxisches Potential zugeschrieben (Carlton, Stack, & Eppley, 1976; Robbers, Hong, Tuite, & Carlton, 1978). Darauf folgende Arbeiten konzentrierten sich hauptsächlich auf das Vorkommen von Xanthomegnin in mit Schimmelpilz kontaminiertem Getreide und damit auch im Tierfutter (Carman, Kuan et al., 1983; Muller & Boley, 1993; Stack, Brown, & Eppley, 1978). Dies stellt für exponierte Tiere eine signifikante Gefahr da, so dass sowohl von der US Food and Drug Administration als auch von der EU Protokolle für die Reduktion von Xanthomegnin und anderen Naphthoquinonen in Tierfutter erstellt wurden (Carman, Kuan, Francis, Ware, & Luedtke, 1984; Muller & Boley, 1993; Stack, Brown, & Eppley, 1978; van Egmond, 1991).

Gupta et. al. untersuchten 2000 die Bedeutung der Xanthomegninproduktion durch *Trichophyton rubrum* in vivo und konnten erstmals Xanthomegnin in infiziertem Haut- und Nagelmaterial nachweisen (Gupta, Ahmad, Borst, & Summerbell, 2000).

Ob und inwieweit Xanthomegnin eine Rolle als Pathogenitätsfaktor bei der Dermatophytose spielt, bleibt jedoch bis heute fraglich. Eine verbreitete Erklärung für die Produktion von sekundären Metaboliten durch Pilze und Pflanzen ist die These, dass es sich hierbei nur um einen metabolischen Überschuss handelt, der keinerlei Funktion besitzt (Weitzman & Summerbell, 1995). Dies ist nicht sicher zu widerlegen, es gibt jedoch plausible Überlegungen, die für eine Funktion von sekundären Metaboliten im ökologischen Kreislauf sprechen.

Einen Ansatz stellt zum Beispiel die Vorstellung dar, dass sekundäre Metabolite wie Xanthomegnin gegen die antagonistische Hautflora vorgehen könnten, so dass sich das Keimspektrum verändert und der pathogene Pilz sich besser ausbreiten kann. Die Produktion von Antibiotika durch Dermatophyten ist schon länger bekannt, 1964 berichteten Smith et. al. von vermehrtem Auftreten von Penicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen bei mit *T. mentagrophytes* infizierten Igeln und bekamen so Hinweise auf die Produktion von Penicillin durch Dermatophyten (Smith & Marples, 1964). Später wurde Penicillin dann auch in vivo in mit Dermatophyten infiziertem Hautmaterial nachgewiesen (Youssef, Wyborn, & Holt, 1978). Xanthomegnin könnte nun unterstützend zu der antibiotischen Komponente antimikrobiell wirken und so Resistenzen umgehen, wie sie vor allem häufig bei *Pseudomonas aeruginosa* vorzufinden sind. Einige *Pseudomonas* Stämme haben nachweislich die Fähigkeit, mykolytisch zu wirken. Häufig werden solche resistenten Stämme von Hautarealen, die gleichzeitig mit Dermatophyten besiedelt sind, isoliert (Summerbell, 2000).

Haraguchi et. al. zeigten, dass von *Fusarium* gebildete Naphthoquinone bei *Pseudomonas aeruginosa* den Sauerstoffverbrauch steigern und die Produktion von Sauerstoffradikalen anregen (Haraguchi, Yokoyama et al., 1997), was eine Erklärung für die nachgewiesene antibakterielle Wirkung einiger Naphthoquinone (Riffel, Medina et al., 2002) liefern würde. Es ist also durchaus möglich, dass auch Xanthomegnin ein solches spezifisches antibakterielles Potential aufweist, hierauf sollten sich weitere Untersuchungen konzentrieren.

Xanthomegnin könnte auch Wirkung auf die lokal zelluläre Immunabwehr in infizierten Hautarealen haben. Der von *Aspergillus fumigatus* produzierte Metabolit

Gliotoxin beispielsweise zerstört Makrophagen durch die Inhibition des Transkriptionsfaktors NFkB und resultierender DNA-Fragmentierung (Pahl, Krauss et al., 1996; Waring, 1990). Somit könnte es als Virulenzfaktor bei opportunistischen Lungeninfektionen immunsupprimierter Patienten dienen (Sutton, Waring et al., 1996). Ob auch Xanthomegnin Einfluss auf immunkompetente Zellen hat, kann im Weiteren untersucht werden.

Dass Xanthomegnin bei der Hautinfektion durch Dermatophyten systemische toxische Effekt hervorruft, wie sie bei Tieren gefunden wurden, ist aufgrund der relativ geringen Menge des produzierten Stoffes unwahrscheinlich (Gupta, Ahmad, Borst, & Summerbell, 2000). Gupta et. al. weisen jedoch darauf hin, dass bei einer ausgedehnten Dermatophytose, wie zum Beispiel der „Moccasin-Tinea“, bei der die gesamte Fußsohle befallen ist, durch die quantitativ höhere und auch zeitlich längere Exposition des Mykotoxins an eine toxische Wirkung zu denken ist. Und auch bei geringeren Infektionen wäre eine zumindest lokale toxische Wirkung denkbar, so dass eine weitere Untersuchung der Vorgänge zweifellos von klinischer Bedeutung ist.

Auf die Methodik und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aufbauend kann Xanthomegnin in seiner Rolle als Stoffwechselmetabolit und Mykotoxin einiger Dermatophyten und seine Bedeutung für die klinische Praxis weiter untersucht werden. Im Vordergrund sollten hierbei vor allem seine Wirkung auf immunkompetente Zellen, beispielsweise dendritische Zellen, sowie auf die mikrobielle Hautflora stehen.

Die eingangs gestellten Fragen können wie folgt beantwortet werden:

1. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nahezu alle untersuchten Dermatophyten sowohl im flüssigen als auch im festen Nährmedium unterschiedlich viel Pigment bilden. Enthält das Medium Tryptophan als einzige Stickstoffquelle, wird mehr Pigment produziert als in Medien, die andere Aminosäuren enthielten. Die Pigmentbildung schreitet im flüssigen Nährmedium wesentlich schneller voran als im festen Medium, ein pH-Wert im sauren Bereich fördert ebenfalls die Produktion von Pigment. Die hier untersuchten Stämme des CBS zeigten sehr wenig bis keine Pigmentbildung, was wahrscheinlich auf die hohe Pleomorphie der Stämme zurückzuführen ist. Ebenso konnte auch beim Wildstamm von *E.floccosum* keine Pigmentbildung nachgewiesen werden.

2. Aus allen pigmentbildenden Stämmen konnte das Pigment extrahiert und die einzelnen Pigmentbestandteile mittels analytischer Dünnschichtchromatographie dargestellt werden. Einzelne Pigmente wurden mit Hilfe von präparativer Dünnschichtchromatographie und HPLC weiter aufgereinigt. Hierbei wurde sich hauptsächlich auf das von *Trichophyton rubrum* produzierte gelbe Pigment konzentriert, welches anhand einer ¹H-NMR als Xanthomegnin identifiziert werden konnte.

3. Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, dass Xanthomegnin von *Trichophyton rubrum* vor allem unter Mangelbedingungen produziert wird. Dazu gehören ein geringes Nahrungsangebot, hier in Form eines Glukose-Nährmediums mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle sowie ein pH-Wert im sauren Bereich (4,7-5,0). Während der Inkubation im Pigment-Medium konnte kein Wachstum des Pilzes gemessen werden. Wurden Stammkulturen aus flüssigem Medium verwendet, die älter als drei Tage waren, konnte kaum noch eine Pigmentproduktion nachgewiesen werden, des Weiteren war nach dem 7.Tag der Inkubation eine Abnahme der Produktion von Xanthomegnin zu verzeichnen.

4. Es konnte eine Methode entwickelt werden, mit der es möglich ist, größere Mengen Xanthomegnin zu produzieren. Dies hat sich in der Vergangenheit immer als problematisch herausgestellt. Xanthomegnin wird von *Trichophyton rubrum* unter den oben genannten Bedingungen produziert. Die Inkubation des Pilzes im flüssigen Nährmedium ermöglicht eine schnelle Pigment- und damit Xanthomegninbildung und gibt, verglichen mit der Verwendung von Agar-Platten, zudem die Möglichkeit, einfach und zeitsparend große Mengen des Pigmentmediums anzusetzen. Das extrahierte Pigment ließ sich sehr gut mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie präparieren, die Durchführung einer Säulenchromatographie war nicht notwendig. Xanthomegnin ließ sich mittels HPLC weiter aufreinigen.

6 Literaturverzeichnis

1. Ajello, L. (1974). Natural history of the dermatophytes and related fungi. *Mycopathol.Mycol.Appl.* 53, 93-110.
2. Apodaca, G. and McKerrow, J. H. (1989). Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. *Infect.Immun.* 57, 3081-3090.
3. Babula, P., Mikelova, R., Adam, V., Kizek, R., Havel, L., and Sladky, Z. (2006). Naphthoquinones--biosynthesis, occurrence and metabolism in plants. *Ceska.Slov.Farm.* 55, 151-159.
4. Baichwal, M. R. And Walker, G. C. (1960). A preliminary investigation of the pigments of *Trichophyton rubrum*. *Can.J.Microbiol.* 6, 383-386.
5. Blank, F., Day, W. C., And Just, G. (1963). Metabolites of pathogenic fungi. II. The isolation of xanthomegnin from *Trichophyton megnini* Blanchard 1896. *J.Invest Dermatol.* 40, 133-137.
6. Blank, F., Ng, A. S., And Just, G. Metabolites of pathogenic fungi V. Isolation and tentative structure of vioxanthin and viopurpurin, two coloured metabolites of *Trichophyton violaceum*. *Canad.J.Chem.* 44, 2873-2879. 1966.
7. Blanz, P., Buzina, W., Ginter, G., and Graser, Y. (2000). [Molecular biological methods and their consequences in taxonomy and diagnosis of dermatophytes]. *Mycoses* 43 Suppl 1, 11-16.
8. Brasch, J. (1990). [Pathogens and pathogenesis of dermatophytoses]. *Hautarzt* 41, 9-15.
9. Brasch, J. (2004). Standard and recently developed methods for the differentiation of dermatophytes. *Hautarzt* 55, 136-142.
10. Brasch, J., Martins, B. S., and Christophers, E. (1991). Enzyme release by *Trichophyton rubrum* depends on nutritional conditions. *Mycoses* 34, 365-368.
11. Brenner, M., Niederwieser, A., Pataki, G., And Fahmy, A. R. (1962). On the reproducibility of Rf in thin layer chromatography. *Experientia* 18, 101-104.
12. Brigham, L. A., Michaels, P. J., and Flores, H. E. (1999). Cell-specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *lithospermum erythrorhizon*. *Plant Physiol* 119, 417-428.
13. Brilhante, R. S., Cordeiro, R. A., Gomes, J. M., Sidrim, J. J., and Rocha, M. F. (2006). Canine dermatophytosis caused by an anthropophilic species: molecular and phenotypical characterization of *Trichophyton tonsurans*. *J.Med.Microbiol.* 55, 1583-1586.
14. Burma, D. P. (1951). Effect of temperature on the Rf values of the amino-acids during paper chromatography with solvents completely miscible with water. *Nature* 168, 565-566.

15. Carlton, W. W., Stack, M. E., and Eppley, R. M. (1976). Hepatic alterations produced in mice by xanthomegnin and viomellein, metabolites of *Penicillium viridicatum*. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 38, 455-459.
16. Carman, A. S., Kuan, S. S., Francis, O. J., Ware, G. M., Gaul, J. A., and Thorpe, C. W. (1983). High pressure liquid chromatographic determination of xanthomegnin in grains and animal feeds. *J.Assoc.Off Anal.Chem.* 66, 587-591.
17. Carman, A. S., Kuan, S. S., Francis, O. J., Ware, G. M., and Luedtke, A. E. (1984). Determination of xanthomegnin in grains and animal feeds by liquid chromatography with electrochemical detection. *J.Assoc.Off Anal.Chem.* 67, 1095-1098.
18. Ciegler, A., Lee, L. S., and Dunn, J. J. (1981). Production of Naphthoquinone Mycotoxins and Taxonomy of *Penicillium viridicatum*. *Appl.Environ.Microbiol.* 42, 446-449.
19. Dahl, M. V. (1993). Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. *J.Am.Acad.Dermatol.* 28, S19-S23.
20. Dahl, M. V. and Grando, S. A. (1994). Chronic dermatophytosis: what is special about *Trichophyton rubrum*? *Adv.Dermatol.* 9, 97-109.
21. Danew, P. and Klossek, P. (1989). The dependence of the physiological properties of *Trichophyton mentagrophytes* on the pH value of the culture medium. *Mycoses* 32, 303-308.
22. Dawson, C. O. And Gentles, J. C. (1961). The perfect states of *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie & Frey and *Microsporum nanum* Fuentes. *Sabouraudia.* 1, 49-57.
23. De Hoog, G. S., Bowman, B., Graser, Y., Haase, G., El Fari, M., Gerrits van den Ende AH, Melzer-Krick, B., and Untereiner, W. A. (1998). Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi. *Med.Mycol.* 36 Suppl 1, 52-56.
24. Duek, L., Kaufman, G., Ulman, Y., and Berdicevsky, I. (2004). The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. *J.Infect.* 48, 175-180.
25. Durley, R. C., MacMillan, J., Simpson, T. J., Glen, A. T., and Turner, W. B. (1975). Fungal products. Part XIII. Xanthomegnin, viomellin, rubrosulphin, and viopurpurin, pigments from *Aspergillus sulphureus* and *Aspergillus melleus*. *J.Chem.Soc.[Perkin 1]* 163-169.
26. Emmons, C. W. Dermatophytes: natural groupings based on the form of the spores and accessory organs. *Arch.Dermatol.Syphilol.* 30, 337-362. 1934.
27. Engelhardt-Zasada, C. and Prochacki, H. (1972). Influence of temperature on dermatophytes. *Mycopathol.Mycol.Appl.* 48, 297-301.

28. F.Blank, C.Buxtorf, O.Chin, G., Just, and Tudor, J. L. (1969). Metabolites of pathogenic fungi. VIII.1 - 3 Floccosin and floccosic acid, two metabolites from *Epidermophyton floccosum* (Harz) Langeron and Milochevitch, 1930. *Can.J.Chem./Rev.can.chim.* 49, 1561-1570.
29. Gatenbeck, S. And Bentley, R. (1965). Naphthaquinone Biosynthesis In Moulds: The Mechanism For Formation Of Javanicin. *Biochem.J.* 94, 478-481.
30. Gill, M. S. W. (1987). Pigments of Fungi (Macromycetes). *Progress in the Chemistry of natural products* Bd. 51.
31. Gräser, Y., De Hoog, S., and Summerbell, R. C. (2006). Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Med.Mycol.* 44, 199-209.
32. Gräser, Y., El Fari, M., Presber, W., Sterry, W., and Tietz, H. J. (1998). Identification of common dermatophytes (Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton) using polymerase chain reactions. *Br.J.Dermatol.* 138, 576-582.
33. Gräser, Y., Kuijpers, A. F., Presber, W., and De Hoog, G. S. (1999). Molecular taxonomy of Trichophyton mentagrophytes and T. tonsurans. *Med.Mycol.* 37, 315-330.
34. Griffin, D. M. (1960). Perfect stage of Microsporum gypseum. *Nature* 186, 94-95.
35. Gupta, A. K., Ahmad, I., Borst, I., and Summerbell, R. C. (2000). Detection of xanthomegnin in epidermal materials infected with Trichophyton rubrum. *J.Invest Dermatol.* 115, 901-905.
36. Gupta, A. K. and Summerbell, R. C. (2000). Tinea capitis. *Med.Mycol.* 38, 255-287.
37. Haraguchi, H., Yokoyama, K., Oike, S., Ito, M., and Nozaki, H. (1997). Respiratory stimulation and generation of superoxide radicals in Pseudomonas aeruginosa by fungal naphthoquinones. *Arch.Microbiol.* 167, 6-10.
38. Hellgren, L. and Vincent, J. (1980). Lipolytic activity of some dermatophytes. *J.Med.Microbiol.* 13, 155-157.
39. Ito, Y., Nozawa, Y., and Kawai, K. (1970). Effect of naphthoquinone pigment, xanthomegnin from Microsporum cookei on the respiration of rat liver mitochondria. *Experientia* 26, 826-827.
40. Ito, Y., Nozawa, Y., and Yoneya, T. Pigment patterns of dermatophytes on thin-layer chromatograms. *J.Chromatogr.* 35, 573-575. 1968.
41. Iwen, P. C., Hinrichs, S. H., and Rupp, M. E. (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med.Mycol.* 40, 87-109.

42. Jones, H. E. (1993). Immune response and host resistance of humans to dermatophyte infection. *J.Am.Acad.Dermatol.* 28, S12-S18.
43. Jung, E. G. and Moll, I. (2003). "Dermatologie." Georg Thieme Verlag, D-70469 Stuttgart.
44. Just, G., Day, W. C., And Blank, F. Metabolites of pathogenic fungi III. The structure of Xanthomegnin. *Canad.J.Chem.* 41, 74-79. 1963.
45. Kalicinski, J., Prochacki, H., and Engelhardt-Zasada, C. (1975). Aflatoxin-like compounds produced by dermatophytes. *Mycopathologia* 55, 23-24.
46. Kawai, K., Akita, T., Nishibe, S., Nozawa, Y., Ogihara, Y., and Ito, Y. (1976). Biochemical studies of pigments from a pathogenic fungus *Microsporum cookei*. III. Comparison of the effects of xanthomegnin and O-methylxanthomegnin on the oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria. *J.Biochem.(Tokyo)* 79, 145-152.
47. Kawai, K., Akita, T., and Nozawa, Y. (1978). Biochemical studies of pigments from a pathogenic fungus *Microsporum cookei*. V. Evidence for the transmembrane permeability of xanthomegnin across phospholipid bilayer membranes. *Experientia* 34, 977-978.
48. Kawai, K. and Cowger, M. L. (1981). The interaction of a quinone pigment, xanthomegnin, with the mitochondrial respiratory chain. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* 32, 499-514.
49. Kawai, K. and Nozawa, Y. (1979). Biochemical studies of pigments from a pathogenic fungus; *Microsporum cookei*. VI. Formation of a xanthomegnin-bypass to the mitochondrial electron transport system. *Experientia* 35, 721-722.
50. Kayser, F. H., Bienz, K. A., and et al (2001). "Medizinische Mikrobiologie." Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
51. Koehne, G. W., Wolf, F. T., And Jones, E. A. (1962). The pigments of *Microsporum cookei*. *J.Invest Dermatol.* 39, 189-197.
52. Koelbing, H. M. (1990). [Johann Lucas Schonlein (1793-1864), a researcher and clinician]. *Hautarzt* 41, 174-177.
53. Kunert, J. (1970). [Conditions for keratin degradation by *Microsporum gypseum* in liquid medium. II. Composition of pH of the medium]. *Dermatol.Monatsschr.* 156, 1035-1041.
54. Kunert, J. (2000). Physiology of keratinophilic fungi. In "Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi" (RKS Kushwaha & J Guarro, Ed.), pp. 77-85. Revista Iberoamericana de Micologia, E-48080 Bilbao.
55. Kushida, T. and Watanabe, S. (1975). Canine ringworm caused by *Trichophyton rubrum*; probable transmission from man to animal. *Sabouraudia*. 13 Pt 1, 30-32.

56. Mayser, P., Stapelkamp, H., Kramer, H. J., Podobinska, M., Wallbott, W., Irlinger, B., and Steglich, W. (2003). Pityrialactone- a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *Malassezia furfur*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 84, 185-191.
57. Mayser, P., Wille, G., Imkamp, A., Thoma, W., Arnold, N., and Monsees, T. (1998). Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. *Mycoses* 41, 265-271.
58. McCabe, M. G. and MIER, P. D. Pigments of Trichophyta. *J.Gen.Microbiol.* 23, 1-7. 1960.
59. Medentsev, A. G. and Akimenko, V. K. (1998). Naphthoquinone metabolites of the fungi. *Phytochemistry* 47, 935-959.
60. Medentsev, A. G., Arinbasarova, A. I., and Akimenko, V. K. (2005). Biosynthesis of naphthoquinone pigments by fungi of the genus *Fusarium*. *Prikl.Biokhim.Mikrobiol.* 41, 573-577.
61. Meevootisom, V. and Niederpruem, D. J. (1979). Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia*. 17, 91-106.
62. Mier, P. D. (1957). Pigments in *Trichophyton rubrum*. *Nature* 179, 1084-1085.
63. Mori, H., Kawai, K., Ohbayashi, F., Kitamura, J., and Nozawa, Y. (1983). Genotoxicity of quinone pigments from pathogenic fungi. *Mutat.Res.* 122, 29-34.
64. Mori, H., Kawai, K., Ohbayashi, F., Kuniyasu, T., Yamazaki, M., Hamasaki, T., and Williams, G. M. (1984). Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocyte primary culture/DNA repair test using rat and mouse hepatocytes. *Cancer Res.* 44, 2918-2923.
65. Muller, H. M. and Boley, A. (1993). Studies on the refrigerated storage of wheat (*Triticum aestivum*). 2. Ergosterol, xanthomegnin, viomellein and brevianamide A after inoculation with *Penicillium viridicatum*. *Zentralbl.Mikrobiol.* 148, 419-431.
66. NG, A. S., G.Just, and F.Blank (1969). Metabolites of pathogenic fungi. VII. On the structure and stereochemistry of xanthomegnin, viioxanthin, and viopurpurin, pigments from *Trichophyton violaceum*. *Can.J.Chem./Rev.can.chim.* 47, 1223-1227.
67. Nozawa, Y. Studies on the pigments of dermatophytes I Chromatographic separation of the pigments of *Trichophyton violaceum*. *Acta Scholae Med.Univ.Gifu* 15, 1-7. 1967.
68. Okafor, J. I. and Ada, N. (2000). Keratinolytic activity of five human isolates of the dermatophytes. *J.Communit.Dis.* 32, 300-305.

69. Pahl, H. L., Krauss, B., Schulze-Osthoff, K., Decker, T., Traenckner, E. B., Vogt, M., Myers, C., Parks, T., Warring, P., Muhlbacher, A., Czernilofsky, A. P., and Baeuerle, P. A. (1996). The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB. *J.Exp.Med.* 183, 1829-1840.
70. Parisot, D., Devis, M., and Barbier, M. Fusarubinoic acid, a new naphthoquinone from the fungus *Nectria haematococca*. *Phytochemistry* 27(9), 3002-3004. 1988.
71. Parisot, D., Devys, M., and Barbier, M. (1990). Naphthoquinone pigments related to fusarubin from the fungus *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *Microbios* 64, 31-47.
72. Paveia, M. H. (1975). Culture medium alkalinization by dermatophytes. (Influence of time and temperature of incubation). *Mycopathologia* 55, 35-40.
73. Peterson, R. E. and Grove, M. D. (1983). Isolation of xanthomegnin from *Penicillium viridicatum* by preparative high-pressure liquid chromatography. *Appl.Environ.Microbiol.* 45, 1937-1938.
74. Pinetti, P. Studi sulla pigmentogenesi del *Trichophyton violaceum*, nota IIa, estrazione e purificazione del pigmento. *Rass.Med.Sarda* 7(8), 1-5. 1949.
75. Pohloudek-Fabini, R., Wollmann, H., and Ganjoo, T. N. Analytisches Verhalten der Pigmente Trichopurpurin und Trichorubin Part 3 Chemische und physiologisch-chemische Studien an Dermatomyeten. *Arch.Pharm.* 300, 492-503. 1967.
76. Prevost, E. (1983). The rise and fall of fluorescent tinea capitis. *Pediatr.Dermatol.* 1, 127-133.
77. Qadripur, S. A. (1989). The lipolytic activity of dermatophytes. *Wien.Med.Wochenschr.* 139, 352-353.
78. Refai, M. and Rieth, H. (1964). Change of the pH value of culture media by dermatophytes. *Zentralbl.Bakteriol.[Orig.]* 194, 114-121.
79. Riffel, A., Medina, L. F., Stefani, V., Santos, R. C., Bizani, D., and Brandelli, A. (2002). In vitro antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 35, 811-818.
80. Rippon, J. W. and LeBeau, L. J. (1965). Germination and initial growth of *Microsporon audouinii* from infected hairs. *Mycopathol.Mycol.Appl.* 26, 273-288.
81. Robbers, J. E., Hong, S., Tuite, J., and Carlton, W. W. (1978). Production of xanthomegnin and viomellein by species of *Aspergillus* correlated with mycotoxicosis produced in mice. *Appl.Environ.Microbiol.* 36, 819-823.
82. Sabouraud, R. (1910). "Les teignes."

83. Samdani, A. J. (2005). Dermatophyte growth and degradation of human stratum corneum in vitro (pathogenesis of dermatophytosis). *J.Ayub.Med.Coll.Abbottabad*. 17, 19-21.
84. Seebacher, C. (2001). "Dermatomykosen." Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
85. Seebacher, C. (2003). The change of dermatophyte spectrum in dermatomycoses. *Mycoses* 46 Suppl 1, 42-46.
86. Seeliger, H. P. (1985). The discovery of *Achorion schoenleinii*. Facts and stories (Johann Lucas Schoenlein and Robert Remak). *Mykosen* 28, 161-182.
87. Silva, M. (1953). Nutritional studies of the dermatophytes; factors affecting pigment production. *Trans.N.Y.Acad.Sci.* 15, 106-110.
88. Silva, M. (1958). The effect of amino acids on the growth and sporulation of *Trichophyton rubrum*; possible application to diagnosis and therapy. *J.Invest Dermatol.* 30, 69-76.
89. Simpanya (2000). Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathology. In "Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi" (RKS Kushwaha & J Guarro, Ed.), pp. 1-12. Revista Iberoamericana de Micologia, E-48080 Bilbao.
90. Smith, J. M. And Marples, M. J. (1964). A Natural Reservoir Of Penicillin-Resistant Strains Of *Staphylococcus Aureus*. *Nature* 201, 844.
91. Spier and Pascher (1955). Free amino acids of the surface of the skin; quantitative analyses determining their physiological significance. *Arch.Klin.Exp.Dermatol.* 200, 59-66.
92. Stack, M. E., Brown, N. L., and Eppley, R. M. (1978). High pressure liquid chromatographic determination of xanthomegnin in corn. *J.Assoc.Off Anal.Chem.* 61, 590-592.
93. Stack, M. E. and Mislivec, P. B. (1978). Production of xanthomegnin and viomellein by isolates of *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium cyclopium*, and *Penicillium viridicatum*. *Appl.Environ.Microbiol.* 36, 552-554.
94. Standke, R. (1972). [*Microsporia canis* in man and animal]. *Dermatol.Monatsschr.* 158, 521-528.
95. Summerbell, R. C. (2000). Form and function in the evolution of dermatophytes. In "Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi" pp. 30-43. Revista Iberoamericana de Micologia, E-48080 Bilbao.
96. Sutton, P., Waring, P., and Mullbacher, A. (1996). Exacerbation of invasive aspergillosis by the immunosuppressive fungal metabolite, gliotoxin. *Immunol.Cell Biol.* 74, 318-322.
97. Tagami, H., Kudoh, K., and Takematsu, H. (1989). Inflammation and immunity in dermatophytosis. *Dermatologica* 179 Suppl 1, 1-8.

98. Takahashi, S. (1962). Morphological, biological and physiological studies of *Trichophyton rubrum*. II. Studies on amino acid assimilation and vitamin requirements. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi* 72, 123-144.
99. Takasuka, T. (2000). Amino acid- or protein-dependent growth of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29, 241-245.
100. Tampieri, M. P. (2004). Update on the diagnosis of dermatomycosis. *Parassitologia* 46, 183-186.
101. Tampieri, M. P. (2006). Mycetes and urban areas. *Parassitologia* 48, 121-124.
102. Tanaka, S., Summerbell, R. C., Tsuboi, R., Kaaman, T., Sohnle, P. G., Matsumoto, T., and Ray, T. L. (1992). Advances in dermatophytes and dermatophytosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 30 Suppl 1, 29-39.
103. Tate. *Parasitology* 21, 31. 1929.
104. Trovato, M. J., Schwartz, R. A., and Janniger, C. K. (2006). Tinea capitis: current concepts in clinical practice. *Cutis* 77, 93-99.
105. Tsuboi, R., Ko, I., Takamori, K., and Ogawa, H. (1989). Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. *Infect. Immun.* 57, 3479-3483.
106. van Egmond, H. P. (1991). Methods for determining ochratoxin A and other nephrotoxic mycotoxins. *IARC Sci. Publ.* 57-70.
107. Vanbreuseghem, R. (1977). Modern classification of dermatophytes. *Dermatologica* 155, 1-6.
108. Vicher, E. E., Lyon, I., and White, E. L. (1959). Studies on the respiration of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia* 11, 185-195.
109. Walker, G. C. and Milovanovic, D. (1970). Pigment formation in the dermatophytes. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 42, 369-379.
110. Waring, P. (1990). DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin does not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels. *J. Biol. Chem.* 265, 14476-14480.
111. Wawrzekiewicz, K., Wolski, T., and Lobarzewski, J. (1991). Screening the keratinolytic activity of dermatophytes in vitro. *Mycopathologia* 114, 1-8.
112. Weitzman, I. and Padhye, A. A. (1996). Dermatophytes: gross and microscopic. *Dermatol. Clin.* 14, 9-22.
113. Weitzman, I. and Summerbell, R. C. (1995). The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 240-259.
114. Wessels, Joseph G. H. Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytol.* 123, 397-413. 1993.

115. Wirth, J. C., O'brien, P. J., Schmitt, F. L., And Sohler, A. (1957). The isolation in crystalline form of some of the pigments of *Trichophyton rubrum*. *J.Invest Dermatol.* 29, 47-53.
116. Wirth, John C., Beesley, Thomas E., and Anand, S. R. The isolation of xanthomegnin from several strains of the dermatophyte, *Trichophyton rubrum*. *Phytochemistry* 4, 505-509. 1964.
117. Youssef, N., Wyborn, C. H., and Holt, G. (1978). Antibiotic production by dermatophyte fungi. *J.Gen.Microbiol.* 105, 105-111.
118. Ziegler, H. and Bohme, H. (1969). [The active alkalization of the nutrient as physiologic principle in keratinolysis by dermatophytes]. *Dermatol.Monatsschr.* 155, 178-181.
119. Zurita, J. and Hay, R. J. (1987). Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes in vitro. *J.Invest Dermatol.* 89, 529-534.
120. Zussman, R. A., Lyon, I., and Vicher, E. E. (1960). Melanoid pigment production in a strain of *Trichophyton rubrum*. *J.Bacteriol.* 80, 708-713.
121. Zussman, R. A., Vicher, E. E., and Lyon, I. (1961). Nutritional and environmental factors affecting pigmentation in *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia* 14, 205-214.

7 Tabellenanhang

Tabelle 7.1

Zusammensetzung von Difco™ Yeast Carbon Base

Kohlenhydrate

Dextrose10.0 g

Aminosäuren

L-Histidine Monohydrochlorid 1.0 mg

LD-Methionin 2.0 mg

LD-Tryptophan 2.0 mg

Vitamine

Biotin 2.0 µg

Calcium Pantothenat 400.0 µg

Folsäure 2.0 µg

Inositol2,000.0 µg

Niacin400.0 µg

p-Aminobenzoidsäure200.0 µg

Pyridoxin Hydrochlorid 400.0 µg

Riboflavin200.0 µg

Thiamin Hydrochlorid400.0 µg

Spurenelemente

Borsäure500.0 µg

Kupfersulfat 40.0 µg

Potassium Iodid..... 100.0 µg

Eisenchlorid 200.0 µg

Mangan Sulfate 400.0 µg

Sodium Molybdat200.0 µg

Zinksulfat400.0 µg

Salze

Monopotassium Phosphat 1.0 g

Magnesium Sulfat 0.5 g

Sodium Chlorid 0.1 g

Calcium Chlorid..... 0.1 g

Tabelle 7.2

Farbbanden der Dünnschichtchromatographie und zugehörige Rf-Werte

T.rubrum

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,17 - 0,24	lila
	0,25	schwach gelb
	0,27-0,30	lila
	0,31	dunkel-lila
	0,33	blass-gelb
	0,38	rosa
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,07	blau
	0,12	blau-grün
	0,17	blau
	0,31	blau
	0,33	blau
	0,34	blau
	0,54	blau
UV 254	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,08	blau
Tageslicht HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,17 - 0,24	lila
	0,25	rot-violett
	0,27-0,30	lila
	0,31	dunkel-lila
	0,33	violett
	0,38	rosa
UV 366 HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,08	blau
	0,17	blau
NH3 Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,16-0,23	blass - lila
	0,25	hellbraun
	0,32	orange
	0,34	blass-braun
NH3 UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,08	blau
	0,17	blau

T.megninii

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,10	blass-violett
	0,18	violett
	0,19-0,23	blass-violett
	0,25	gelb
	0,26-0,30	blass-violett
	0,31	violett
	0,33	gelb-braun
	0,38	rosa
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,07	blau
	0,29	blau
	0,32	blau
UV 254	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,07	blau
Tageslicht HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,10	blass-violett
	0,18	violett
	0,19-0,23	blass-violett
	0,25	gelb
	0,26-0,30	blass-violett
	0,31	violett
	0,33	gelb-braun
	0,38	rosa
UV 366 HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,07	blau
NH3 Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,10	blass-violett
	0,17	blass-blau
	0,25	rot-blau
	0,32	gelb-orange
	0,34	rosa-rot
NH3 UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,07	blau

T.rubrum granulare

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,05	grau
	0,18	violett
	0,25	gelb
	0,31	violett
	0,33	gelb-braun
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,08	blau
	0,54	grün-blau
UV 254	Rf-Wert	Farbe
	0,08	blau
Tageslicht HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,05	grau
	0,18	violett
	0,25	gelb
	0,31	violett
	0,33	gelb-braun
UV 366 HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,08	schwach blau
NH3 Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,04	blass-grau
	0,18	blass-blau
	0,26	rot-braun
	0,34	rot-violett
NH3 UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,08	schwach-blau

T.soudanense

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,19	braun
	0,25	gelb
	0,31	blass-violett
	0,33	blass-gelb
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,04	blau
	0,07	blau
	0,53	grün
UV 254	Rf-Wert	Farbe
	0,04	blau
Tageslicht HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,19	braun
	0,25	gelb
	0,31	blass-violett
	0,33	blass-violett
UV 366 HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,04	blau
NH3 Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,19	braun
	0,25	rot-braun
NH3 UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,04	blau

M.canis

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,03	Blass-gelb
	0,25-0,35	violett
	0,36	Dunkelviolett
	0,38	violett
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,13	hellblau
	0,25	Schwach-blau
	0,32	Schwach-blau
UV 254	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,13	blau
Tageslicht HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,25-0,34	violett
	0,35	Dunkel-violett
	0,36	blau
	0,39	rosa
UV 366 HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,13	blau
Tageslicht NH3	Rf-Wert	Farbe
	0,24-0,35	orange
	0,36	Dunkel-orange
UV 366 NH3	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,13	blau

T.mentagrophytes

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,13	grau
	0,25	violett
	0,26-0,34	hellviolett
	0,36	pink
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,01-0,09	blau
	0,12	hellblau
	0,23	grün
	0,27	Schwach-grün
	0,58	Schwach-grün
UV 254	Rf-Wert	Farbe
	0,02	blau
	0,09	Blau
	0,11	hellblau
Tageslicht HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,12	grau
	0,3	hellblau
	0,35	violett
	0,36	blau
	0,38	Blass-rosa
UV 366 HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,01-0,09	blau
	0,12	hellblau

	0,23	grün
Tageslicht NH3	Rf-Wert	Farbe
	0,12	grau
	0,31	grau
	0,37	orange
UV 366 NH3	Rf-Wert	Farbe
	0,01-0,09	blau
	0,12	hellblau

T.mentagrophytes erinacei

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,13	grau
	0,25	violett
	0,26-0,34	hellviolett
	0,36	pink
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,01-0,09	blau
	0,12	hellblau
UV 254	Rf-Wert	Farbe
	0,02	blau
	0,09	Blau
	0,11	hellblau
Tageslicht HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,12	grau
	0,3	hellblau
	0,35	violett
	0,36	blau
	0,38	rosa
UV 366 HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,01-0,09	blau
	0,12	hellblau
Tageslicht NH3	Rf-Wert	Farbe
	0,12	grau
	0,31	grau
	0,37	orange
	0,39	Blass-rosa
UV 366 NH3	Rf-Wert	Farbe
	0,01-0,09	blau
	0,12	hellblau

T.equinum

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,25	Dunkel-violett
	0,26-0,35	violett
	0,36	Rot-violett
	0,4	Blass-orange
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,11	blau
	0,32	blau
	0,36	Schwach-grün
	0,42	Grün
	0,49	grün
	0,52	grün
UV 254	Rf-Wert	Farbe
	0,1	blau
Tageslicht HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,23-0,34	violett
	0,35	Dunkel-violett
	0,38	gelb
UV 366 HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,1	blau
	0,5	grün
Tageslicht NH3	Rf-Wert	Farbe
	0,31	Schwach-violett
	0,36	orange
UV 366 NH3	Rf-Wert	Farbe
	0,1	blau
	0,5	grün

M.cookei

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,25	Blass-violett
	0,28	gelb
	0,3	Blass lila
	0,34	gelb
	0,38	Blass-gelb
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,03	Schwach blau
	0,13	Schwach blau
UV 254	Rf-Wert	Farbe
	0,02	Schwach blau
Tageslicht HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,25	Blass-violett
	0,28	gelb
	0,3	Blass violett
	0,34	gelb
	0,36	violett
	0,38	Blass-gelb
	0,39	Blass-rosa
UV 366 HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,02	Sehr schwach blau

Tageslicht NH3	Rf-Wert	Farbe
	0,27	Blass violett
	0,3	Blass blau
	0,34	Rot-violett
	0,37	Blass violett
UV 366 NH3	Rf-Wert	Farbe
	0,02	Blau (kaum sichtbar)

K.ajelloi

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,06	braun
	0,10	braun-orange
	0,14	blass-gelb
	0,21	blau
	0,26	blau
	0,30	blau
	0,39	blau-violett
	0,41	blau-violett
	0,44	rosa-orange
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,02	blau
	0,08	blau
	0,19	blau
UV 254	Rf-Wert	Farbe
	0,01	blau
	0,08	blau
Tageslicht HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,06	braun
	0,10	braun-orange
	0,14	blass-gelb
	0,21	blau
	0,26	blau
	0,30	blau
	0,39	kräftiges blau-violett
	0,41	kräftiges blau-violett
	0,44	kräftiges rosa
UV 366 HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,08	blau
	0,17	blau
NH3 Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,06	blass - braun
	0,09	hellbraun
	0,26	violett
	0,30	violett
	0,32	violett
	0,38	gelb
	0,41	gelb
	0,44	blass-gelb
NH3 UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,07	blau
	0,18	blau

T.verrucosum

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,02	blass-braun
	0,14	blass-gelb
	0,18	blass-gelb
	0,20	blass-braun
	0,23	blau
	0,27	orange
	0,31	rosa
	0,37	blau-violett
	0,38	gelb
	0,40	blau-violett
	0,43	schwach-rosa
	0,46	gelb
	0,48	rosa-violett
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,08	blau
	0,14	grün-blau
	0,44	grün
UV 254	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,08	blau
	0,49	grün
Tageslicht HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,13	schwach-gelb
	0,17	blass-gelb
	0,19	blass-rosa
	0,22	kräftiges blau-violett
	0,27	orange
	0,30	pink
	0,36	kräftiges blau-violett
	0,39	kräftiges blau-violett
	0,42	kräftiges rosa
	0,45	kräftiges gelb
	0,47	rosa-violett
UV 366 HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,08	blau
	0,49	grün
NH3 Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,21	braun
	0,27	schwach-orange
	0,30	schwach-rosa
	0,36	orange
	0,39	rosa-orange
	0,45	hellgelb
	0,48	violett
NH3 UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,01	schwach-blau
	0,06	blau
	0,12	grün-blau
	0,17	grün
	0,44	grün

T.schoenleinii

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,08	violett
	0,14	gelb
	0,18	blass-braun
	0,20	blass-braun
	0,23	blau
	0,29	blass-blau
	0,37	blau-violett
	0,38	gelb
	0,39	blau-violett
	0,43	schwach-rosa
	0,46	gelb
	0,48	rosa-violett
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,08	blau
	0,18	grün-blau
	0,45	grün
UV 254	Rf-Wert	Farbe
	0,02	blau
	0,49	grün
Tageslicht HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,06	hellblau
	0,08	pink
	0,11	blass-rosa
	0,13	gelb
	0,18	orange-braun
	0,22	blau
	0,36	kräftiges blau-violett
	0,39	kräftiges blau-violett
	0,42	kräftiges rosa
	0,45	kräftiges gelb
	0,47	rosa-violett
UV 366 HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,01	blau
	0,06	blau
	0,43	grün
NH3 Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,08	blass-braun
	0,13	hell-gelb
	0,18	hellbraun
	0,21	schwach-blau
	0,36	braun
	0,39	braun
	0,44	gelb
NH3 UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,01	schwach-blau
	0,06	blau
	0,44	grün

T.gallinae

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,10	gelb-braun
	0,24	bläss-blau
	0,37	braun-grau
	0,39	blau
	0,43	rosa
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,08	blau
	0,33	blau
	0,58	blau
Tageslicht HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,10	gelb-braun
	0,24	bläss-blau
	0,37	violett
	0,39	blau
	0,43	rosa
UV 366 HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,56	blau
NH3 Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,09	bläss-braun
	0,36	braun
	0,39	orange
	0,44	gelb
NH3 UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,01	schwach-blau
	0,06	blau
	0,44	grün

T.audouinii

Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,04	hellbraun
	0,10	braun
	0,22	orange
	0,34	hellgelb
	0,42	gelb
	0,44	rosa
UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,05	blau
	0,08	blau
	0,57	blau
UV 254	Rf-Wert	Farbe
	0,02	blau
	0,08	blau
	0,38	blau
Tageslicht HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,05	braun
	0,09	braun
	0,34	gelb
	0,36	violett
	0,38	violett
	0,42	pink
UV 366 HCL	Rf-Wert	Farbe
	0,03	blau
	0,05	blau
	0,08	blau
NH3 Tageslicht	Rf-Wert	Farbe
	0,04	hellbraun
	0,10	braun
	0,22	orange
	0,34	hellgelb
	0,42	hellbraun
NH3 UV 366	Rf-Wert	Farbe
	0,07	blau

8 Zusammenfassung

Das Mykotoxin Xanthomegnin wird als sekundärer Stoffwechselmetabolit von verschiedenen pathogenen Pilzen produziert und zählt zu der Gruppe der Naphthoquinone. Es wurde erstmals 1963 aus dem Dermatophyten *T. megninii* extrahiert und ist heute hauptsächlich aufgrund seiner nephro- und auch hepatotoxischen Wirkung auf Nutztiere bekannt, die mit Schimmelpilzen kontaminiertem Getreidefutter ausgesetzt waren. Des Weiteren wurde Xanthomegnin auch in vivo in mit *Trichophyton rubrum* infiziertem Haut- und Nagelmaterial nachgewiesen. Aufgrund der großen Instabilität der Substanz war es bisher immer sehr schwierig, Xanthomegnin vollständig zu isolieren. In der vorliegenden Arbeit wurde eine einfache und wenig zeitintensive Methode entwickelt, Xanthomegnin in größeren Mengen aus *Trichophyton rubrum* zu extrahieren.

Um eine Pigmentproduktion zu induzieren, wurde entsprechendes Pilzmaterial in einem flüssigen Nährmedium inkubiert, welches 1 % Glucose, 0,1g% KH_2PO_4 und 0,05g% MgSO_4 enthielt. Der pH-Wert wurde auf 4,7 eingestellt. Nach Extraktion mit Ethylacetat konnte das Pigment mittels Dünnschichtchromatographie sowie HPLC dargestellt und weiter aufgereinigt werden. Die Identifikation der Substanz erfolgte zunächst anhand eines auf der Dünnschichtplatte mitgelaufenen Xanthomegnin-Standards. Mittels einer NMR-Spektroskopie konnte schließlich anhand der Strukturformel das extrahierte gelbe Pigment als Xanthomegnin identifiziert werden. Um eine quantitative Analyse des Stoffes vorzunehmen, wurde zudem eine densitometrische Messung durchgeführt. Die maximale Produktionsmenge von Xanthomegnin konnte so nach 7 Tage Inkubation ermittelt werden. 0,5 g trockenes Pilzmaterial produzierten nach 7 Tagen 1019,6 μg Xanthomegnin.

Im Gegensatz zu früher verwendeten Methoden konnte hier eine effizientere Methode entwickelt werden, Xanthomegnin aus Pilzkulturen zu isolieren. Hierauf basierend können nun weitere Untersuchungen dieser Substanz folgen, vor allem auf ihren Einfluss auf immunkompetente Zellen der Haut und auf die kutane Mikroflora.

9 Summary

Xanthomegnin is a mycotoxin and a naphthoquinone metabolite of several pathogenic fungi. It was first extracted in 1963 from *T.megninii* and today it is mainly known as an agent that causes nephropathy and death in farm-animals that were exposed to contaminated food, but it has also been found *in vivo* in skin and nail materials infected with *Trichophyton rubrum*. Hitherto the isolation of Xanthomegnin has been quite complex because of the instability of the pigment. This study develops a more simple and less time-consuming method to extract Xanthomegnin from *Trichophyton rubrum* in larger quantities.

To induce pigment production, *Trichophyton rubrum* was incubated in a liquid culture medium that contained 1 % Glucose, 0,1g% KH_2PO_4 und 0,05g% MgSO_4 , the pH-value was adjusted at 4,7. After extraction with ethylacetate the pigment could be prepared via thin layer chromatography (TLC) and also high pressure liquid chromatography (HPLC). The identification of the substance was for a start carried out using a Xanthomegnin-standard that was developed together with the sample extract on the thin layer board. A quantitative analysis of the substance was made by densitometric measurement.

The comparison with the standard sample and the results of HPLC let us assume that the extracted substance is Xanthomegnin. After 7 days of incubation a maximum amount of production could be observed. 1 g of fungal material produced 1019,6 μg of the extracted pigment after 7 days.

In contrast to methods that were used before we could develop a more efficient method to isolate Xanthomegnin from *Trichophyton rubrum*. Based on this study more investigations of the metabolite could take place, especially of its effects on immunocompetent cells of the skin and on the cutaneous microflora.

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Mayser danken. Durch die interessante Themenstellung, Hilfe bei Problemlösungen und immer neuen Anregungen hat er ein Stück seiner Begeisterung für die Mykologie an mich weiter gegeben.

Des Weiteren gilt mein Dank der Arbeitsgruppe von Dr. Spiteller am Institut für organische Chemie und Biochemie II der TU München für die Analyse der extrahierten Substanz.

Für die Bereitstellung der Standard-Proben des Xanthomegnins danke ich der Forschungsgruppe Lauber vom Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim. Ich danke außerdem den Mitarbeitern der klinischen Forschungsgruppe „Respiratorische Insuffizienz“ (Prof Seeger) für die Hilfe bei der Durchführung der densitometrischen Versuche und die Bereitstellung der Geräte.

Herrn Dr. H.-J. Krämer danke ich für die ständige Bereitschaft zur Hilfestellung bei Problemen, bei Entwicklung neuer Ideen und bei der Durchführung der HPLC, die maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke Frau Förste und Frau Gries für die Bereitstellung von Nährböden und viele hilfreiche Ratschläge.

Ich danke meinen Mitdoktoranden und –doktorandinnen für die ausgesprochen gute und angenehme Zusammenarbeit im Labor, sie hat dazu beigetragen, dass ich immer viel Freude an der Arbeit dort hatte.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die große Unterstützung, die sie mir während der ganzen Zeit uneingeschränkt entgegen gebracht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Anna Regina Tigges
geboren	16.10.1979 in Menden
Schulbildung	
1986 – 1990	Grundschule Brabeck Hemer
1990 – 1999	Friedrich-Leopold-Woeste-Gymnasium Hemer
Berufsausbildung	
1999 – 2001	Ausbildung zur Arzthelferin, Berufsschule Menden Praxis Dr. Tigges, Arzt für Kinder- und Jugendmedizin, Iserlohn
Akademische Ausbildung	
2001 – 2007	Justus-Liebig-Universität Gießen Studium der Humanmedizin
Berufstätigkeit	
seit Januar 2008	Assistenzärztin am Kinderhospital Osnabrück e.V.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Münster, im Juni 2008